



**Mariana Lopes Paiva**

Licenciada em Engenharia do Ambiente  
(Instituto Superior de Agronomia, Universidade de Lisboa)

## **Valorização Energética e Material de Resíduos Lenhocelulósicos Pulverizados com Contaminação Polimérica**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em  
Engenharia das Energias Renováveis

Orientação: Mário Ventim Neves, Professor Auxiliar,  
Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de  
Lisboa

Co-orientadora: Catarina Pereira Nobre, Mestre em  
Bioenergia, Faculdade de Ciências e Tecnologia da  
Universidade Nova de Lisboa

Júri:

Presidente: Doutora Anabela Monteiro Gonçalves Pronto

Arguente: Doutora Paula Alexandra Rodrigues e Araújo Guedes

Vogal: Mestre Catarina Pereira Nobre



FACULDADE DE  
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

**setembro 2017**



Mariana Lopes Paiva

Licenciada em Engenharia do Ambiente

Instituto Superior de Agronomia, Universidade de Lisboa

# **Valorização Energética e Material de Resíduos Lenhocelulósicos Pulverizados com Contaminação Polimérica**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em

Engenharia das Energias Renováveis

Orientador: Mário Ventim Neves, Professor Auxiliar, Faculdade de Ciências e  
Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa

Co-orientadora: Catarina Pereira Nobre, Mestre em Bioenergia, Faculdade de  
Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa

setembro 2017



## **Copyright**

### **“Valorização Energética e Material de Resíduos Lenhocelulósicos Pulverizados com Contaminação Polimérica”**

Copyright © Mariana Lopes Paiva, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.



## **Partes deste trabalho submetidas para publicação**

Paiva, M., Nobre, C., Gonçalves, M., Mendes, B. (2017) "Evaluation of waste powders containing biomass and polymers as raw materials for bioethanol production", Book of Proceedings *WASTES: Solutions, treatments and opportunities*, Porto, Portugal, pp. 26–28





## **Agradecimentos**

Ao Professor Mário Ventim Neves pelo seu apoio e disponibilidade demonstrados ao longo do mestrado.

À Professora Margarida Gonçalves, por me ter disponibilizado este tema, com o qual tanto aprendi. Um sincero obrigado pela sua confiança, preocupação, partilha do saber e por ser um exemplo de profissionalismo e dedicação para todos.

À minha co-orientadora, Mestre Catarina Nobre, por ter sido incansável no seu apoio, esclarecendo todas as minhas dúvidas, a qualquer hora do dia ou noite. Em momentos de maior stress foste tu quem me apoiou e quem me orientou na direção certa. A tua simpatia, dedicação, apoio e carinho deram-me alento para continuar a dar o melhor de mim. Tive muita sorte em ter-te como orientadora, professora e amiga.

Às empresas CITRI - Centro Integrado de Tratamento de Resíduos Industriais, S.A. e CMC Biomassa Lda., por me disponibilizarem os resíduos estudados nesta dissertação.

À minha família do 367, Ricardo, Inês, Noe, Marcelo, Catarina Viegas e Ezequiel, por me terem acolhido tão bem na vossa equipa e por todo o companheirismo, entreaajuda e boa disposição. A todos os professores ou colegas do DCTB que, de algum modo, me ajudaram na realização desta tese.

Ao meu grande amigo e colega de vida universitária, Vasco Jorge, cujo sentido de humor, companheirismo, lealdade e amizade não têm comparação. Estou muito grata de ter feito esta viagem contigo, tornaste-a muito mais fácil.

Aos meus pais e irmã, por toda a paciência e compressão demonstradas não só nesta fase final, mas ao longo de toda a minha vida académica. Agradeço especialmente aos meus pais por terem financiado todo o meu ensino superior, sem o vosso apoio não teria o mesmo desfecho. Um grande, grande obrigado.

Ao meu Nuno, por me ajudar mesmo sem saber.



## Resumo

As matérias-primas estudadas neste trabalho são resíduos lenhocelulósicos industriais, produzidos em elevadas quantidades. O principal objetivo deste trabalho foi a avaliação do potencial para produção de bioetanol dos resíduos CITRI A e CITRI B. Estes são formados no processo de moagem de vários tipos de materiais (resíduos poliméricos, têxteis, borracha, beatas de cigarro, entre outros) durante a produção de combustíveis derivados de resíduos (CDR). Ambos se apresentam na forma pulverizada, sendo posteriormente depositados em aterros sanitários. Como termo de referência, foi também estudado um resíduo de composição homogênea, o resíduo CMC, resultante da moagem de madeira de pinho, na indústria de mobiliário.

Primeiramente, foi feita uma caracterização das matérias-primas, para avaliar o seu conteúdo em polímeros sacarificáveis. Desta caracterização resultou um teor de holocelulose de  $66,2 \pm 1,9\%$ ,  $63,2 \pm 3,3\%$  e  $58,6 \pm 2,1\%$  para o resíduo CMC, CITRI A e CITRI B, respetivamente, e um teor em lenhina Klason de  $27,1 \pm 1,8\%$ ,  $27,1 \pm 3,9\%$  e  $33,8 \pm 0,9\%$  para os mesmos. Após a caracterização, testaram-se diferentes pré-tratamentos (alcalinos, com ácido diluído e hidrotérmico) para remoção ou transformação da lenhina e hemiceluloses, tendo sido variadas condições de reação, como temperatura, tempo de contacto e concentração de catalisador. O pré-tratamento com ácido sulfúrico de 1%, 120 °C e 30 minutos alcançou uma recuperação de celulose de  $70,2 \pm 0,2\%$  para o resíduo CMC e de  $57,7 \pm 0,4\%$  para o resíduo CITRI A. O tratamento hidrotérmico apresentou recuperações de celulose comparáveis ao tratamento ácido, mas a sua aplicação numa escala industrial apresenta algumas limitações económicas. Paralelamente, foi também avaliado o teor em compostos fenólicos totais na fração líquida resultante dos pré-tratamentos, obtendo-se uma concentração máxima de  $1269,6 \pm 44,2 \text{ mg.L}^{-1}$  e  $963,4 \pm 68,1 \text{ mg.L}^{-1}$  para os resíduos CITRI A e CMC, respetivamente. Como etapa seguinte aos pré-tratamentos, realizou-se uma hidrólise ácida, e de acordo com o teor de açúcares redutores obtido, foi calculado um rendimento teórico de produção de bioetanol. Este rendimento foi mais acentuado após a aplicação do pré-tratamento com ácido diluído, o que prova o benefício da sua utilização. Os resíduos pré-tratados apresentaram assim um rendimento teórico em bioetanol de 40,6%, 23,3% e 11,1%, para as amostras CMC, CITRI B e CITRI A, respetivamente.

Além da valorização energética, foram adicionalmente realizados ensaios para avaliação do potencial de adsorção azul-de-metileno na amostra CITRI A, de forma a validar uma aplicação da perspetiva de valorização material para este tipo de resíduos. Os resultados obtidos nestes ensaios demonstraram a capacidade deste resíduo em atuar como adsorvente industrial para espécies catiónicas, registando-se taxas de remoção superiores a 95% na maior parte das condições testadas.

**Palavras-chave:** resíduos, lenhocelulósico, pulverizado, bioetanol, contaminação polimérica, adsorvente.



## Abstract

The feedstocks studied in this work are industrial lignocellulosic residues, produced in high quantities. The main objective of this work was to evaluate the potential for bioethanol production of CITRI A and CITRI B waste samples. These wastes are produced in the grinding process of various types of materials (polymeric residues, textiles, rubber, cigarette beads, among others) during the production of refuse derived fuel (RDF). Both residues are powders without any type of recovery or valorization, and as such they are deposited in landfills. Moreover, a residue of homogeneous composition (CMC), which results from the milling of pine wood in the furniture industry, was used as a reference.

Firstly, a characterization of the raw materials was done to evaluate its potential for saccharification. This characterization resulted in a holocellulose content of  $66.2 \pm 1.9\%$ ,  $63.2 \pm 3.3\%$  and  $58.6 \pm 2.1\%$  for CMC, CITRI A and CITRI B samples, respectively. Klason lignin presented values of  $27.1 \pm 1.8\%$ ,  $27.1 \pm 3.9\%$  and  $33.8 \pm 0.9\%$  for the samewaste samples. After characterization, different pretreatments (alkaline, dilute acid and hydrothermal) were tested for lignin and hemicelluloses removal and/or transformation, using different reaction conditions, such as temperature, contact time and catalyst concentration. Pretreatment with sulfuric acid 1%, 120 ° C and 30 minutes achieved a cellulose recovery of  $70.2 \pm 0.2\%$  for the CMC sample and  $57.7 \pm 0.4\%$  for the CITRI A sample. The hydrothermal treatment presented recoveries of cellulose comparable to the acid treatment, but its application on an industrial scale presents some economic limitations. At the same time, the total phenolic content in the liquid fraction resulting from the pretreatment was evaluated, obtaining a maximum concentration of  $1269.6 \pm 44.2 \text{ mg.L}^{-1}$  and  $963.4 \pm 68.1 \text{ mg.L}^{-1}$  for CITRI A and CMC samples, respectively.

After pretreatments, acid hydrolysis was performed and according to the reducing sugar content obtained, a theoretical yield of bioethanol production was calculated. This yield was higher after the application of the pretreatment with dilute acid, which proves the benefit of its use. The pretreated wastes thus presented a theoretical bioethanol yield of 40.6%, 23.3% and 11.1%, for CMC, CITRI B and CITRI A samples, respectively.

In addition to energy recovery, tests were also carried out to evaluate the potential of methylene blue adsorption in the CITRI A sample. These assays were done in order to validate a material reuse perspective for this type of waste. The results obtained in these tests demonstrated the ability of this residue to act as an industrial adsorbent for cationic species, with removal rates above 95% in most of the tested conditions.

**Keywords:** residues, lignocellulosic, pulverized, bioethanol, polymeric contamination, adsorbent.



## Índice

Copyright .....	v
Partes deste trabalho submetidas para publicação .....	vii
Agradecimentos.....	ix
Resumo .....	xi
Abstract .....	xiii
Índice .....	xv
Índice de figuras .....	xviii
Índice de tabelas .....	xxi
Lista de abreviaturas .....	xxiii
Capítulo 1 - Introdução e objetivos .....	1
Capítulo 2 - Estado da arte .....	3
2.1. Produção e gestão de resíduos .....	3
2.2. Produção e gestão de resíduos lenhocelulósicos.....	5
2.3. Composição da biomassa lenhocelulósica .....	7
2.3.1. Celulose.....	10
2.3.2. Hemiceluloses .....	10
2.3.3. Lenhina .....	11
2.4. Valorização energética de materiais lenhocelulósicos para produção de biocombustíveis.....	12
2.4.1. Benefícios ambientais e socioeconómicos dos biocombustíveis.....	13
2.4.2. Sustentabilidade dos processos de produção de biocombustíveis .....	15
2.4.3. Promoção de biocombustíveis a nível europeu e nacional.....	18
2.4.4. Bioetanol.....	20
2.4.5. Conversão de biomassa lenhocelulósica em bioetanol .....	26
2.5. Valorização material de resíduos lenhocelulósicos .....	43
Capítulo 3 - Metodologia .....	45
3.1. Matérias-primas.....	46
3.2. Caracterização das amostras.....	47
3.3. Pré-tratamentos.....	55
3.4. Hidrólise ácida .....	58
3.5. Avaliação do potencial de produção de bioetanol.....	58
3.6. Tratamento estatístico dos resultados .....	58
3.7. Ensaio de adsorção – Valorização material .....	58
Capítulo 4 - Apresentação e discussão de resultados.....	63
4.1. Caracterização das amostras .....	63
4.1.1. Análise imediata .....	63
4.1.2. Análise elementar .....	65
4.1.3. Distribuição granulométrica .....	68
4.1.4. Análise composicional .....	70

4.1.5.	Açúcares totais e açúcares redutores .....	73
4.2.	Pré-tratamentos .....	74
4.2.1.	Composição da fração sólida após pré-tratamento .....	77
4.2.2.	Composição da fração líquida resultante do pré-tratamento .....	87
4.3.	Hidrólise ácida.....	90
4.4.	Potencial de produção de bioetanol nas condições estudadas.....	92
4.5.	Ensaio de adsorção.....	93
4.5.1.	Variação da dose de adsorvente.....	94
4.5.2.	Variação da concentração de azul-de-metileno .....	96
4.5.3.	Variação do tempo de contacto.....	97
4.5.4.	Variação do pH.....	98
4.5.5.	Ensaio de dessorção .....	99
Capítulo 5 - Conclusões e perspectivas futuras .....		101
Referências bibliográficas .....		103





## Índice de figuras

Figura 2.1 - Fontes de biomassa lenhocelulósica residual .....	6
Figura 2.2 - Resíduos lenhocelulósicos e respetiva gestão contabilizados na União Europeia (28 países) em 2014 .....	7
Figura 2.3 - Resíduos lenhocelulósicos e respetiva gestão contabilizados em Portugal no ano de 2014.....	7
Figura 2.4 - Composição da biomassa lenhocelulósica.....	8
Figura 2.5 - Cadeia de celulose. ....	10
Figura 2.6 - Álcoois precursores da lenhina, p-cumarílico (MH), coniferílico (MG) e sinapílico (MS).....	12
Figura 2.7 - Produção global de etanol por país/região.....	22
Figura 2.8 - Produtividade anual de etanol amiláceo e celulósico por ano (valores posteriores a 2017 correspondem a estimativas efetuadas com base no modelo de desenvolvimento atual)..	23
Figura 2.9 - Representação da estrutura de uma biomassa lenhocelulósica antes e depois de ser aplicado um pré-tratamento .....	27
Figura 2.10 - Processo simplificado da hidrólise de celulose e hemiceluloses presentes na biomassa pré-tratada. ....	39
Figura 3.1 - Esquema sequencial das atividades laboratoriais realizadas no presente estudo..	45
Figura 3.2 - Resíduos lenhocelulósicos heterogéneos – a) “CITRI A”, b) “CITRI B” .....	46
Figura 3.3 - Resíduo lenhocelulósico homogéneo – “CMC” .....	46
Figura 3.4 - Exemplo de reta de calibração utilizada para a determinação de açúcares totais. ....	52
Figura 3.5 - Reações de redução e oxidação do reagente de ácido 3,5-dinitrossalicílico e da glucose, respetivamente .....	53
Figura 3.6 - Reta de calibração utilizada para a determinação de açúcares redutores. ....	54
Figura 3.7 - Reta de calibração utilizada para a determinação de compostos fenólicos totais. ....	55
Figura 3.8 - Sistema de refluxo utilizado para a realização dos pré-tratamentos alcalinos.....	56
Figura 3.9 - Sistema de dissolução utilizado nos pré-tratamentos ácidos.....	56
Figura 3.10 - Autoclave utilizada no pré-tratamento de água líqüida sobreaquecida.....	57
Figura 3.11 - Resíduo lenhocelulósico com contaminação polimérica utilizado no estudo do presente capítulo.....	59
Figura 3.12 - Exemplo de reta de calibração de azul-de-metileno. ....	59
Figura 4.1 - Frações líqüidas resultantes do pré-tratamento aplicado ao resíduo CITRI A com (a) KOH aquoso; (b) KOH metanólico; (c) Água destilada e cinzas de biomassa.....	75
Figura 4.2 - Frações líqüidas resultantes do pré-tratamento aplicado ao resíduo CMC com (a) KOH aquoso; (b) KOH metanólico; (c) Água destilada e cinzas de biomassa. ....	75
Figura 4.3 - Frações sólidas da biomassa (a) CITRI A e (b) CMC após pré-tratamento com (1) KOH aquoso; (2) KOH metanólico; (3) Água destilada e cinzas. ....	75
Figura 4.4 - Frações líqüidas resultantes dos ensaios de pré-tratamento ácido com variação de (a) concentração do ácido; (b) tempo de residência; (c) temperatura de reação. 1- CITRI A, 2- CMC. ....	76
Figura 4.5 - Aspeto geral dos resíduos sólidos da biomassa CITRI A (esquerda) e CMC (direita), após pré-tratamentos ácidos. ....	76
Figura 4.6 - Frações líqüidas das biomassas CITRI A (líqüido com coloração negra) e CMC (líqüido alaranjado) resultantes do tratamento com água líqüida sobreaquecida. ....	77
Figura 4.7 - Aspeto das frações sólidas das biomassas CITRI A (esquerda) e CMC (direita), resultantes do tratamento com água líqüida sobreaquecida. ....	77

Figura 4.8 - Teor de celulose (% m/m) após pré-tratamentos alcalinos. Barras da mesma cor classificadas com letras diferentes apresentam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ).....	78
Figura 4.9 - Produtos de degradação da celulose em condições ácidas .....	79
Figura 4.10 - Teor de celulose (% m/m) após ensaios de pré-tratamento onde se fez variar A) a concentração do ácido (tempo de residência de 30 minutos, temperatura = 160 °C) e B) o tempo de residência, (concentração de ácido sulfúrico de 1 % m/m, temperatura = 160 °C). Barras da mesma cor classificadas com letras diferentes apresentam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ). .....	80
Figura 4.11 - Teor de celulose (% m/m) após ensaios de pré-tratamento ácido onde se fez variar a temperatura de reação. As restantes condições de ensaio consistiram numa concentração de ácido de 1 % m/m e num tempo de residência de 60 minutos. Barras da mesma cor classificadas com letras diferentes apresentam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ). .....	81
Figura 4.12 - Teor de celulose (% m/m) após pré-tratamento hidrotérmico. ....	83
Figura 4.13 - Teor de celulose (% m/m) após todos os ensaios de pré-tratamento realizados. Barras da mesma cor classificadas com letras diferentes apresentam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ). .....	86
Figura 4.14 - Concentração de compostos fenólicos totais contidos nas frações líquidas após pré-tratamentos. ....	88
Figura 4.15 - Teor de açúcares totais e redutores nas biomassas originais e pré-tratadas.....	91
Figura 4.16 - Estrutura molecular do azul-de-metileno (adaptado de Jia et al. 2017).....	94
Figura 4.17 - Aspeto final dos ensaios onde se testou o efeito da dose de adsorventes.....	94
Figura 4.18 - Efeito da dose de adsorvente na eficiência de remoção e na quantidade adsorvida. ....	95
Figura 4.19 - Aspeto final dos ensaios onde se testou o efeito da variação da concentração de azul-de-metileno. ....	96
Figura 4.20 - Efeito da concentração do corante na eficiência de remoção e na quantidade adsorvida. ....	96
Figura 4.21 - Efeito do tempo de contacto entre o adsorvente e o analito na eficiência de remoção e na quantidade adsorvida. ....	97
Figura 4.22 - Efeito da variação de pH na eficiência de remoção e na quantidade adsorvida. .	98
Figura 4.23 - Exemplo de aspeto final da solução ácida após ensaio dessorção. ....	99



## Índice de tabelas

Tabela 2.1 – Quantidade ( $\times 103$ ) (toneladas) de resíduos processados na União Europeia, em 2014 (Eurostat, 2017).....	3
Tabela 2.2 - Valor da Taxa de Gestão de Resíduos (Assembleia da República, 2014). ....	4
Tabela 2.3 - Percentagem de Taxa de Gestão de Resíduos aplicadas consoante a operação dada como destino aos resíduos (Assembleia da República, 2014). ....	4
Tabela 2.4 - Contextualização e objetivos dos Planos Estratégicos para os Resíduos Urbanos e para os Resíduos Industriais (Agência Portuguesa do Ambiente, 2017b, 2017c). ....	5
Tabela 2.5 - Conteúdos em celulose, hemiceluloses e lenhina em diversos materiais lenhocelulósicos. ....	9
Tabela 2.6 - Caracterização de alguns biocombustíveis gasosos e líquidos. ....	13
Tabela 2.7 - Principais benefícios ambientais e socioeconómicos resultantes da produção e utilização de biocombustíveis.....	14
Tabela 2.8 - Teores de incorporação de biocombustíveis, em teor energético, em Portugal, para o setor dos transportes, apresentados no Decreto-Lei n.º 117/2010. ....	20
Tabela 2.9 - Características de combustíveis líquidos comuns.....	21
Tabela 2.10 - Indústrias norte-americanas e canadianas atualmente envolvidas na produção e desenvolvimento de etanol celulósico.....	25
Tabela 2.11 - Principais indústrias de etanol celulósico na Europa.....	26
Tabela 2.12 - Fatores-chave num eficiente pré-tratamento a uma biomassa lenhocelulósica. .	28
Tabela 2.13 - Comparação entre os diferentes pré-tratamentos utilizados na parte laboratorial deste trabalho. ....	36
Tabela 2.14 - Resumo dos outros tipos e tecnologias de pré-tratamentos. ....	37
Tabela 3.1 - Condições de reação em cada ensaio de pré-tratamento ácido realizado. ....	57
Tabela 3.2 - Ensaio de adsorção realizados. ....	60
Tabela 4.1 - Valores médios e respetivos desvios-padrão obtidos na análise imediata. ....	63
Tabela 4.2 - Valores médios e respetivos desvios-padrão obtidos na análise elementar.....	66
Tabela 4.3 - Valores médios e desvios-padrão obtidos na análise à distribuição granulométrica. ....	68
Tabela 4.4 - Valores médios e respetivos desvios-padrão obtidos na análise composicional (*Base livre de extrativos). ....	70
Tabela 4.5 - Conteúdo em açúcares totais e redutores dos resíduos. ....	73
Tabela 4.6 - Teores de açúcares totais e redutores após pré-tratamento com ácido diluído. ...	90
Tabela 4.7 - Rendimento teórico de bioetanol obtido para cada resíduo no seu estado original e após pré-tratamento. ....	92



## **Lista de abreviaturas**

ASTM – American Society for Testing and Materials  
CE – Comunidade Europeia  
CIEC – Código dos Impostos Especiais de Consumo  
CBP – “Consolidated Bioprocessing”  
CDR – Combustíveis Derivados de Resíduos  
DA – Ácido Diluído  
DNS – Ácido 3,5-dinitrossalicílico  
EM – Estado-Membro  
UE - União Europeia  
EUA – Estados Unidos da América  
FAO – Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação  
FPU – Unidades de Papel de Filtro  
GEE – Gases com Efeito de Estufa  
HMF – Hidroximetilfurfural  
IUPAC – União Internacional de Química Pura e Aplicada  
LHW – “Liquid Hot Water”  
OCDE – Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Económico  
PERH – Plano Estratégico de Resíduos Hospitalares  
PERSU – Plano Estratégico para os Resíduos Urbanos  
PESGRI – Plano Estratégico de Gestão dos Resíduos Industriais  
RU – Resíduos Urbanos  
SHF – “Separate Hydrolysis and Fermentation”  
SSF – “Simultaneous Saccharification and Fermentation”  
SSCF – “Simultaneous Saccharification and Co-Fermentation”  
TGR – Taxa de Gestão de Resíduos  
UV – Ultravioleta

## **Unidades de medida**

bar – unidade de medida de pressão  
cm – centímetro  
°C – Graus Celsius (unidade de medida de temperatura)  
€ – Euro  
g – Grama  
h – Hora  
L – Litro  
M – Milhão  
MPa – Mega Pascal  
mg – miligrama  
mL – Mililitro  
mm – Milímetro  
nm – Nanómetro  
rpm – rotações por minuto  
ton – tonelada  
µm – micrómetro





## Capítulo 1 – Introdução e objetivos

Os combustíveis fósseis são ainda muito utilizados para colmatar a elevada procura energética atualmente existente. No entanto, devido a questões relacionadas com o contínuo aumento populacional, obrigações ambientais nacionais e problemas envolvidos na gestão de resíduos, tem havido um aumento de interesse no aproveitamento de matérias-primas que promovam um desenvolvimento sustentável. É neste sentido que se insere a Diretiva 2009/28/CE do Parlamento Europeu e do Conselho, relativa à promoção da utilização de energia proveniente de fontes renováveis. A mesma estabelece que cada Estado-Membro deve assegurar que a sua quota de energia proveniente de fontes renováveis consumida por todos os modos de transporte em 2020 represente, pelo menos, 10% do consumo final de energia nos transportes nesse Estado-Membro.

Na perspetiva de bioenergia, incluem-se os resíduos lenhocelulósicos, cuja fração não reciclável pode ser integrada na produção de combustíveis derivados de resíduos (CDR). A produção deste tipo de combustíveis engloba uma sequência de etapas (recolha seletiva, seleção de materiais, trituração e eliminação ou valorização) da qual resultam resíduos industriais com composição heterogénea (lenhocelulósica e polimérica). Estes subprodutos, produzidos na etapa de trituração, são aspirados pelos sistemas de ventilação e despejados em aterros sanitários. O principal objetivo deste estudo é avaliar o potencial de valorização destes resíduos lenhocelulósicos contaminados, já que a eliminação por deposição em aterro é a última das opções sugeridas pela Diretiva 2008/98/CE.

Visto que as matérias-primas em estudo se apresentam numa forma pulverizada, e dada a sua composição lenhocelulósica, as mesmas exibem especial interesse para valorização energética por produção de bioetanol, bem como a sua utilização material como adsorventes de baixo custo. Dada a pequena dimensão das partículas, torna-se desnecessária a aplicação de onerosos pré-tratamentos físicos, diminuindo assim o custo total de produção de bioetanol. Além disso, o facto de estes resíduos apresentarem elevada área superficial, supõe um elevado rendimento na etapa de hidrólise (aumentando a produção do biocombustível), além de uma significativa vantagem no fenómeno de adsorção superficial.

Assim, as atividades incluídas neste trabalho, e de seguida enumeradas, conduzem a uma avaliação do potencial de valorização destes resíduos lenhocelulósicos contaminados, tanto numa vertente energética (por conversão em açúcares fermentáveis para a produção de bioetanol), como material (enquanto adsorventes industriais de baixo custo).

- 1) Dado que a valorização energética de CDR levanta questões ao nível da elevada heterogeneidade, baixa densidade e elevados teores de humidade e cinzas, é de assumir que a valorização dos sub-produtos por conversão térmica seja limitada (Nobre et al., 2016). Deste modo realizou-se, numa primeira etapa, uma caracterização físico-química dos resíduos em estudo, de modo a confirmar a adequabilidade dos

mesmos à valorização energética por produção de bioetanol. Assim, foram analisadas as composições imediata, elementar e composicional, bem como determinado o teor de açúcares totais e redutores das matérias-primas no seu estado nativo.

- 2) Aplicação de diferentes pré-tratamentos (alcalinos, ácidos e hidrotérmico), avaliando a capacidade de recuperação de celulose nos resíduos sólidos após cada pré-tratamento, assim como o teor em compostos fenólicos nas frações líquidas dos pré-tratamentos;
- 3) Aplicação do processo de hidrólise ácida ao resíduo sólido proveniente do pré-tratamento com melhores características de recuperação de celulose;
- 4) Avaliação do teor de açúcares totais e redutores no hidrolisado, comparando os valores obtidos com os mesmos teores resultantes das matérias-primas no seu estado nativo, de forma a validar a utilização do pré-tratamento selecionado nas matérias-primas em estudo.
- 5) Avaliação do potencial de adsorção de pigmentos catiónicos nos resíduos pulverizados, através de ensaios sequenciais de adsorção e dessorção, de forma a validar uma aplicação da perspectiva de valorização material.

## Capítulo 2 - Estado da arte

### 2.1. Produção e gestão de resíduos

O setor dos resíduos tem, nos últimos anos, assumido especial importância a nível nacional e comunitário. Em 2014, a União Europeia e Portugal geraram, respetivamente, cerca de 2 495 e 15 megatoneladas de resíduos, o equivalente a 4,9 e 1,4 toneladas geradas por cada cidadão europeu e português (Eurostat, 2017). Tendo em consideração estas estimativas, torna-se cada vez mais necessária a gestão e aproveitamento dos resíduos produzidos, no sentido de atribuir o estatuto de “recurso” ou de “matéria-prima secundária” a resíduos cujos ciclos são encaminhados no sentido de se reintegrarem na cadeia produtiva. A tabela 2.1 apresenta a quantidade de resíduos recuperados, incinerados ou depositados em aterros sanitários na União Europeia em 2014.

Tabela 2.1 - Quantidade ( $\times 10^3$ ) (toneladas) de resíduos processados na União Europeia, em 2014 (Eurostat, 2017).

	<b>Total</b>	<b>Deposição em aterro</b>	<b>Incineração ou recuperação energética</b>	<b>Recuperação não energética</b>
<b>Total</b>	2 319 520	1 100 350	107 930	1 076 700
<b>Papel e cartão</b>	35 510	130	380	34 990
<b>Borracha</b>	2 630	20	1 180	1 410
<b>Plásticos</b>	12 810	730	1 730	10 270
<b>Madeira</b>	43 680	460	22 630	20 200
<b>Têxteis</b>	1 850	150	150	1 530

A Diretiva 2008/98/CE do Parlamento Europeu e do Conselho de 19 de Novembro de 2008 estabelece medidas de proteção do ambiente e da saúde humana, prevenindo ou reduzindo os impactos negativos provocados pela produção e gestão de resíduos (Parlamento Europeu e do Conselho, 2008). Para isto, estabelece uma “hierarquia dos resíduos”, aplicável enquanto princípio geral da política de prevenção e gestão de resíduos:

1. Prevenção e redução;
2. Preparação para a reutilização;
3. Reciclagem;
4. Outros tipos de valorização, por exemplo a valorização energética;
5. Eliminação.

A referida diretiva determina ainda que os produtores e detentores de resíduos devem proceder eles próprios ao tratamento dos mesmos, ou confiar esse tratamento a um operador oficialmente reconhecido. As autoridades nacionais competentes devem elaborar planos de gestão de resíduos e programas de prevenção de resíduos.

Neste contexto criou-se, a nível nacional, o Regime Geral de Gestão de Resíduos, aprovado pelo decreto-lei n.º 178/2006 de 5 de setembro, que transpõe para a ordem jurídica interna a Diretiva n.º 2008/98/CE, relativa aos resíduos. O mesmo é aplicável às operações de gestão de

resíduos, como recolha, transporte, armazenagem, triagem, tratamento, valorização e eliminação de resíduos, bem como às operações de descontaminação de solos e à monitorização dos locais de deposição após o encerramento das respetivas instalações.

Este documento criou ainda a Taxa de Gestão de Resíduos (TGR), recentemente alterada na Lei n.º 82-D/2014 de 31 de dezembro, que pretende contribuir para a redução da produção de resíduos e gestão mais eficiente dos mesmos. Esta gestão deve ter em consideração os produtores de resíduos e consumidores, custos ambientais associados e estimular o cumprimento dos objetivos nacionais em matéria de gestão de resíduos (Agência Portuguesa do Ambiente, 2017). As tabelas 2.2 e 2.3 apresentam, respetivamente, os valores aplicados à TGR entre 2015 a 2020 e a percentagem da mesma aplicada consoante o destino dos resíduos.

Tabela 2.2 - Valor da Taxa de Gestão de Resíduos (Assembleia da República, 2014).

Ano	2015	2016	2017	2018	2019	2020
<b>TGR (€ ton<sup>-1</sup>)</b>	5,5	6,6	7,7	8,8	9,9	11,0

Tabela 2.3 - Percentagem de Taxa de Gestão de Resíduos aplicadas consoante a operação dada como destino aos resíduos (Assembleia da República, 2014).

<b>Operação</b>	<b>Percentagem da TGR a pagar</b>
Deposição em aterro (eliminação)	100%
Incineração (eliminação)	70%
Valorização energética (valorização)	25%

Desde 2000 que as práticas de tratamento de resíduos têm melhorado consideravelmente na União Europeia (EU), dado que a deposição em aterros sanitários (opção menos economicamente aconselhada) tem sido gradualmente substituída pela reciclagem, compostagem e incineração (Eurostat, 2015). Esta melhoria deve-se a diretivas e estratégias nacionais impostas pela União Europeia, entre as quais, a Diretiva 1999/31/CE do Conselho, de 26 de abril de 1999, relativa à deposição de resíduos em aterro. A mesma estabelece metas para a redução da quantidade de resíduos municipais depositados em aterros sanitários, com o objetivo de minimizar as emissões de gases com efeito de estufa (GEE) associadas à gestão dos mesmos (Conselho da União Europeia, 1999). Assim, estabeleceu-se a meta de reduzir a quantidade de resíduos municipais biodegradáveis depositada em aterro até uma percentagem de 35% até 2016 [ou 2020 se o Estado-Membro (EM) apresentou uma taxa de aterro superior a 80% no ano de referência de 1995].

Em Portugal, o Decreto-Lei n.º 183/2009, de 10 de agosto transpõe para a ordem jurídica interna a Diretiva n.º 1999/31/CE e estabelece o regime jurídico da deposição de resíduos em aterro, bem como os requisitos gerais a observar na conceção, construção, exploração, encerramento e pós-encerramento de aterros (Ministério do Ambiente do Ordenamento do

Território e do Desenvolvimento Regional, 2009). O presente Decreto-Lei tem como objetivo reduzir os impactos ambientais negativos decorrentes da deposição de resíduos em aterro, quer à escala local (poluição das águas superficiais e subterrâneas, do solo e da atmosfera), quer à escala global (efeito de estufa), bem como quaisquer riscos para a saúde humana (Agência Portuguesa do Ambiente, 2017a).

A nível nacional, as orientações estratégicas para a gestão de resíduos foram consagradas em vários planos específicos, nomeadamente o Plano Estratégico de Resíduos Hospitalares (PERH), o Plano Estratégico para os Resíduos Urbanos (PERSU) e o Plano Estratégico de Gestão dos Resíduos Industriais (PESGRI) (tabela 2.4).

Tabela 2.4 - Contextualização e objetivos dos Planos Estratégicos para os Resíduos Urbanos e para os Resíduos Industriais (Agência Portuguesa do Ambiente, 2017b, 2017c).

<b>Instrumento de planeamento</b>	<b>Objetivos e áreas de atuação</b>
<b>Plano Estratégico para os Resíduos Urbanos (PERSU 2020)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Define a política, orientações e prioridades para os resíduos urbanos.</li> <li>• Objetivos:               <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Minimizar os impactos negativos dos resíduos geridos como recursos endógenos, mas aproveitando o seu valor socioeconómico;</li> <li>○ Eficiência na utilização e gestão dos recursos primários e secundários;</li> <li>○ Eliminação progressiva da deposição de resíduos em aterro, com vista à erradicação da deposição direta de RU em aterro até 2030;</li> <li>○ Aproveitamento do potencial do setor dos RU para estimular economias locais e a economia nacional;</li> <li>○ Envolvimento do cidadão na estratégia dos RU, através de facilitar a redução da produção e a separação, tendo em vista à reciclagem.</li> </ul> </li> </ul>
<b>Plano Estratégico dos Resíduos Industriais (PESGRI 2001)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Define os princípios estratégicos a que deve obedecer a gestão deste tipo de resíduos no território nacional;</li> <li>• Objetivos:               <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Prevenção da produção de resíduos;</li> <li>○ Promoção da reutilização e reciclagem;</li> <li>○ Desenvolvimento da autossuficiência do país em matéria de gestão de resíduos tendo em vista a criação de um sistema integrado de tratamento de resíduos industriais.</li> </ul> </li> </ul>

## 2.2. Produção e gestão de resíduos lenhocelulósicos

As áreas de atividade que geram biomassa lenhocelulósica residual podem ser divididas em vários grupos (figura 2.1). Estas fontes de biomassa são das maiores, mais promissoras e disponíveis a nível mundial. Estes resíduos podem ser utilizados para produção de biocombustíveis líquidos ou sólidos, praticamente sem a necessidade de maior ocupação de solos e sem interferência na produção de bens alimentares (Sims, Taylor, Jack, & Mabee, 2008).

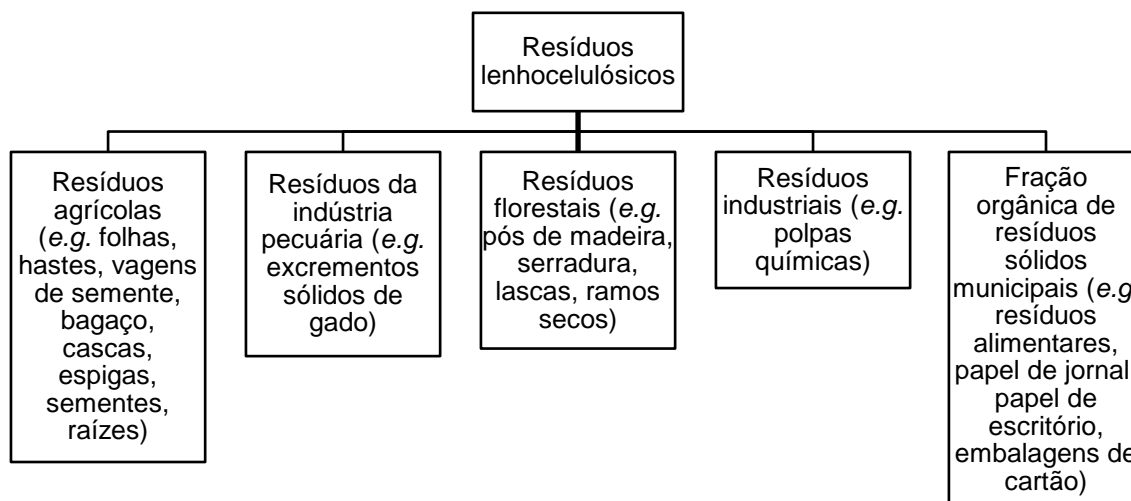


Figura 2.1 - Fontes de biomassa lenhocelulósica residual (adaptado de Zabed, Sahu, Boyce, & Faruq, 2016).

A maioria dos resíduos agrícolas mundiais (produção anual estimada entre 2802 e 3758 milhões ton.ano<sup>-1</sup>) (Zabed et al., 2016) é obtida a partir de quatro culturas típicas: milho, trigo, arroz e cana-de-açúcar. A restante biomassa residual agrícola integra apenas uma pequena quantidade de biomassa total mundial (Zabed et al., 2016). Um dos resíduos lenhocelulósicos mais promissores para produção de bioetanol é o resíduo de milho. Nesta categoria está incluída a biomassa que resta após a maçaroca ser retirada, incluindo taludes, folhas, espigas e cascas. Estes resíduos apresentam uma taxa de produção aproximada de 9,9 ton.ha<sup>-1</sup> (Kim & Dale, 2004).

Os resíduos sólidos municipais (produção anual estimada de 20,7 milhões de ton.ano<sup>-1</sup> numa área urbana de 217 milhões de habitantes) (Zabed et al., 2016) têm sido considerados como os materiais celulósicos recicláveis que podem ter origem doméstica ou não. Este tipo de materiais (fração orgânica), embora possam ser utilizados para produção de bioetanol, não são considerados a matéria-prima ideal, devido à sua grande diversificação composicional, podendo implicar a existência de contaminantes (Zabed et al., 2016).

Relativamente à gestão de resíduos lenhocelulósicos, apresenta-se nas figuras 2.2 e 2.3 a quantidade de papel e cartão, resíduos agrícolas vegetais e resíduos de madeira, cujo destino se conhece, na União Europeia e em Portugal, respetivamente, no ano de 2014.

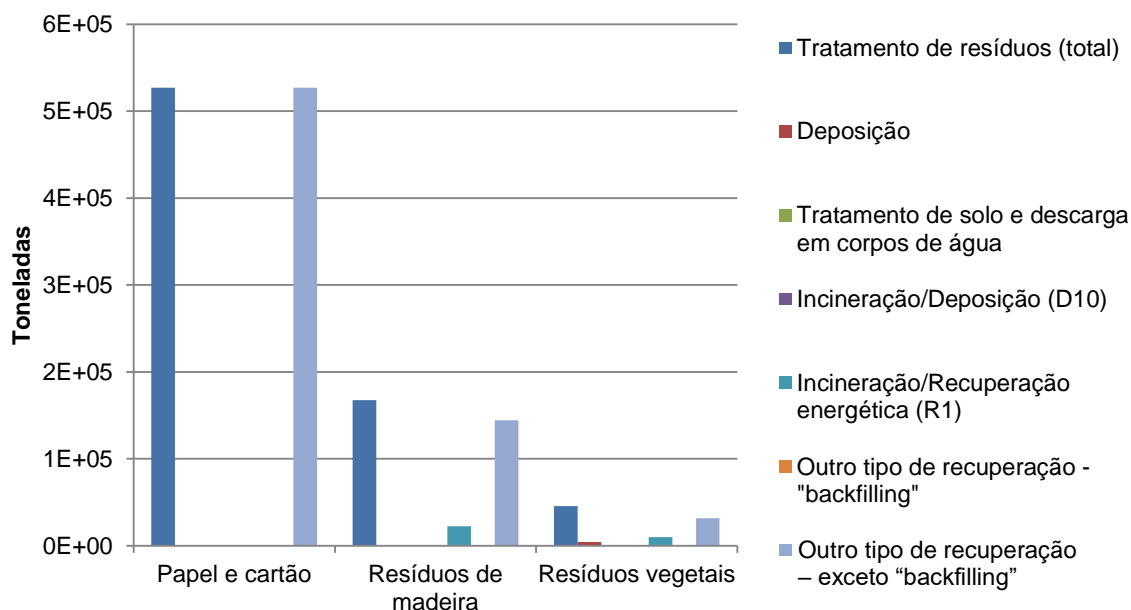


Figura 2.2 - Resíduos lenhocelulósicos e respetiva gestão contabilizados na União Europeia (28 países) em 2014 (Eurostat, 2017).

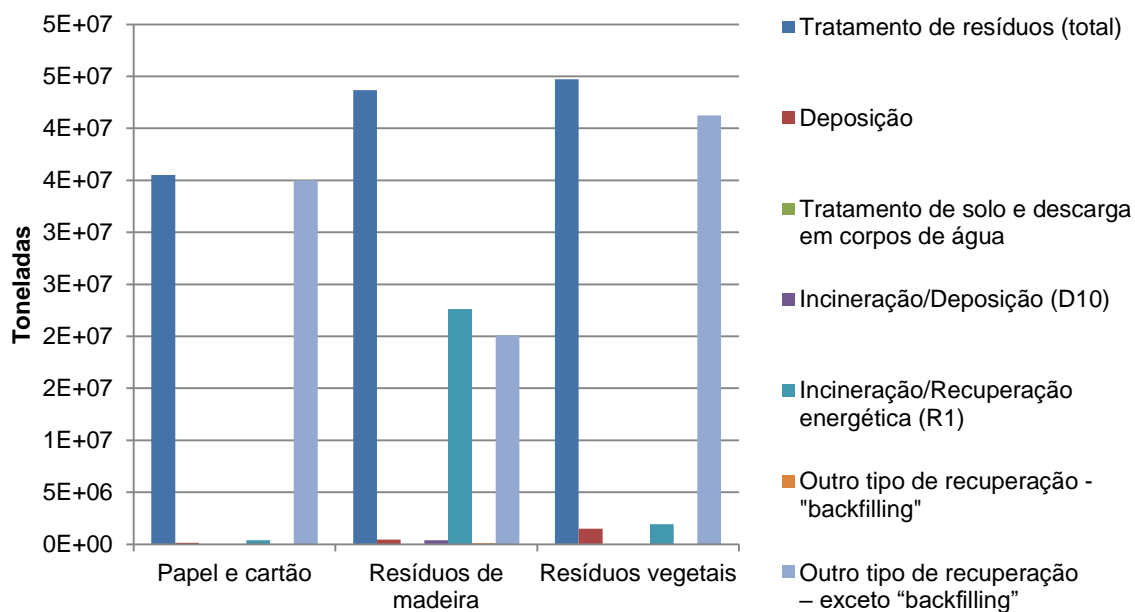


Figura 2.3 - Resíduos lenhocelulósicos e respetiva gestão contabilizados em Portugal no ano de 2014 (Eurostat, 2017).

### 2.3. Composição da biomassa lenhocelulósica

A composição química dos materiais lenhocelulósicos é determinante para sua eficiência enquanto biocombustível. Embora varie consoante o material genético e as condições ambientais a que a biomassa foi sujeita, a típica composição química dos materiais lenhocelulósicos é de 48% carbono, 6% hidrogénio, 45% oxigénio e ainda uma pequena percentagem de matéria inorgânica (Balat, 2011).

Os principais componentes da parede celular das células de biomassa lenhocelulósica são a celulose (entre 30 a 60% do peso total da matéria seca), as hemiceluloses (15 a 40%) e a lenhina (15 a 25%) e outros elementos em pequenas quantidades, como extrativos (1 a 10%) (R. Pettersen, 1984; Shaoni Sun, Sun, Cao, & Sun, 2016) (figura 2.4). Os polissacarídeos, celulose e hemiceluloses, encontram-se ligados à lenhina na parede celular através de ligações covalentes e pontes de hidrogénio, de tal modo que conferem robustez à biomassa lenhocelulósica (Sarkar et al. 2012).

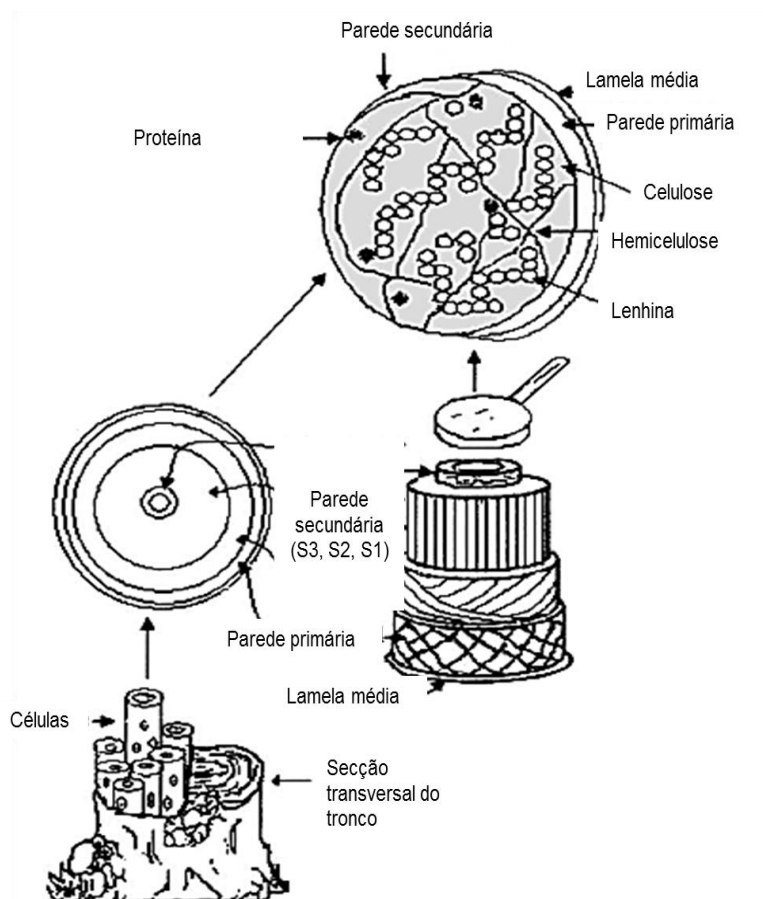


Figura 2.4 - Composição da biomassa lenhocelulósica (adaptado de Sánchez 2009).

A parede celular é formada por cinco camadas concêntricas com diferentes composições químicas: lamela média, parede primária e três camadas de parede secundária – exterior (S1), intermédia (S2) e interior (S3). A lamela média apresenta uma espessura de 0,05 a 0,20  $\mu\text{m}$  e atua como elemento de separação entre células, sendo principalmente constituída por lenhina (70 a 80%), hemiceluloses e pectinas. A parede primária, com espessura de 0,1 - 0,2  $\mu\text{m}$ , contém cerca de 10% da celulose, 20% das hemiceluloses e 70% de lenhina presente na parede celular. Finalmente, a parede secundária compõe cerca de 80% do peso seco da parede vegetal, sendo maioritariamente constituída por celulose e hemiceluloses. Dentro da parede secundária encontra-se o lúmen, onde se encontram as substâncias intracelulares (Pedro, 2013; Schwarze, 2007) .



A percentagem de celulose, hemiceluloses e lenhina na biomassa varia consoante o tipo de matéria-prima que lhe deu origem e as suas propriedades físicas (tabela 2.5) (Byadgi & Kalburgi 2016).

Tabela 2.5 - Conteúdos em celulose, hemiceluloses e lenhina em diversos materiais lenhocelulósicos.

Material lenhocelulósico	Celulose (%)	Hemiceluloses (%)	Lenhina (%)
Hastes de angiospérmicas	40 – 55	24 – 40	15 – 20
Hastes de gimnospérmicas	45 – 50	25 – 35	25 – 35
Choupo ( <i>Populus</i> )	48 – 50	27 – 29	18 – 19
Pinheiro ( <i>Pinus</i> )	44 – 46	9 – 26	29
Eucalipto ( <i>Eucalyptus</i> )	40 – 50	16 – 17	22 – 27
“Switchgrass” ( <i>Panicum virgatum</i> )	45	31	12
<i>Miscanthus</i>	40	18	25
Gramíneas (geral)	25 – 40	25 – 50	10 – 30
Cana-de-açúcar	25	17	12
Casca de noz	25 – 30	25 – 30	30 – 40
Carolo de milho	39 – 47	26 – 39	5 – 15
Palha de trigo	30 – 38	26 – 32	15 – 19
Palha de arroz	28 – 36	23 – 28	12 – 14
Palha de aveia	31 – 37	27 – 38	16 – 19
Papel de escritório	85 – 99	0	0 – 15
Papel de jornal	40 – 55	25 – 40	18 – 30
Resíduos sólidos municipais (geral)	33 – 49	9 – 16	10 – 14

Fontes: Sun & Cheng 2002; Haghighi Mood et al. 2013; Byadgi & Kalburgi 2016; Balat 2011; Zabed et al. 2016

Em conjunto, os polímeros de celulose e hemiceluloses constituem a holocelulose, que assim representa cerca de dois terços do peso total seco da biomassa (Zabed et al., 2016).

Para além destes três componentes macromoleculares presentes na biomassa lenhocelulósica, existem ainda componentes de baixo peso molecular, como os extrativos (compostos orgânicos) e as cinzas (compostos inorgânicos). Os extrativos, ou extratáveis, são agrupados consoante a sua estrutura química e polaridade (fração hidrofílica e fração lipofílica). Englobam compostos como as gorduras, ceras (álcoois de maior peso molecular), terpenos, ácidos e álcoois gordos, flavonoides, esteróis, taninos entre outros. As cinzas representam menos de 1%, sendo constituídas principalmente por sais, sulfatos, oxalatos, carbonatos, fosfatos e silicatos de cálcio, potássio e magnésio (Pedro, 2013; Isabel, 2014).

### 2.3.1. Celulose

A celulose, de fórmula química  $(C_6H_{10}O_5)_n$ , é o polímero orgânico mais abundante na terra, sendo o constituinte principal da madeira e estando maioritariamente localizada na parede secundária das células. Muitas das propriedades da celulose dependem do seu grau de polimerização, isto é, do número de moléculas de glucose que constituem uma molécula de celulose.

Trata-se de um homopolímero linear, com elevado grau de polimerização e massa molecular, que consiste numa cadeia linear de monómeros de D-glucose, unidos por ligações glicosídicas  $\beta$ -1,4 (figura 2.5). Este arranjo, em conjunto com o facto de haver grupos hidroxilo em ambos os lados dos monómeros, permite a formação de pontes de hidrogénio entre os polímeros de celulose. Por sua vez, a associação entre as moléculas de celulose resulta na formação de microfibrilas, onde zonas cristalinas (altamente organizadas) alternam com regiões amorfas (estruturas desordenadas) (Haghighi Mood et al., 2013; Agbor et al., 2011).

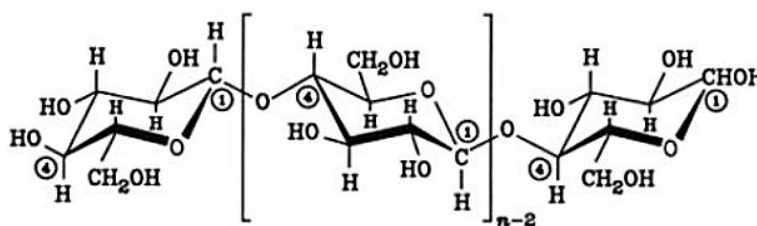


Figura 2.5 - Cadeia de celulose.

A presença de regiões com diferentes graus de organização confere à celulose uma reatividade química diferente a reagentes, sendo que, geralmente, as zonas cristalinas reagem mais lentamente e são quimicamente mais resistentes que as amorfas. No seu conjunto, dado o elevado número de ligações de hidrogénio, a celulose apresenta uma estrutura robusta e compacta, insolúvel à água e resistente à despolimerização. Para além de influenciar a reatividade química, o grau de cristalinidade afeta também as propriedades químicas e físicas das fibras. Na madeira, calcula-se que cerca de 50-90% da celulose esteja na forma cristalina (Hendriks & Zeeman, 2009; Achinas & Euverink, 2016).

### 2.3.2. Hemiceluloses

Ao contrário da celulose, as hemiceluloses são compostas por diferentes monómeros, sendo por isso denominadas de heteropolímeros. Os monómeros que fazem parte da sua constituição podem variar entre pentoses (como a  $\beta$ -D-xilose,  $\alpha$ -D-arabinopirranose e  $\alpha$ -D-arabinofuranose), hexoses ( $\beta$ -D-glucose,  $\beta$ -D-manose e  $\alpha$ -D-galactose) e ácidos urónicos (como os ácidos  $\beta$ -D-glucorónico,  $\alpha$ -D-4-O-metilglucorónico e  $\alpha$ -D-galacturónico). Por vezes, quando os grupos hidroxilo são parcialmente substituídos pelos grupos acetilos, estão presentes outros açúcares

em pequena quantidade como  $\alpha$ -D-ramnose e  $\alpha$ -L-fucose (desoxioses) (Sun et al., 2010; Zabed et al., 2016).

A cadeia principal de hemiceluloses é principalmente constituída de xilano por ligações  $\beta$ -1,4, que incluem D-xilose (cerca 90%) e L-arabinose (aproximadamente 10%). Assim, os xilanos são os principais componentes, embora a sua composição varie entre matérias-primas, estando maioritariamente presentes em angiospérmicas, resíduos florestais, agrícolas, industriais e resíduos sólidos municipais. Relativamente a gimnospérmicas, como o pinheiro, sequoias ou ciprestes, as hemiceluloses são ricas em glucomananos (Zabed et al., 2016).

As hemiceluloses possuem a função de interligar a lenhina às fibras de celulose tornando a matriz mais rígida. Para aumentar a digestibilidade da celulose, uma boa quantidade de hemiceluloses tem de ser removida, uma vez que cobrem as fibrilhas de celulose limitando a sua disponibilidade na hidrólise ácida ou enzimática. As hemiceluloses são relativamente fáceis de hidrolisar uma vez que são essencialmente amorfas, com cadeias estruturais mais pequenas e ramificadas e um peso molecular mais baixo, comparativamente à celulose. No entanto, visto que a composição das hemiceluloses varia entre matérias-primas, são necessárias diversas variedades de enzimas para que ocorra uma hidrólise complementar. De notar ainda que parâmetros como a temperatura ou o tempo de retenção devem ser controlados no sentido de evitar a formação de produtos indesejados que poderão inibir o processo de fermentação, como furfural e hidroximetilfurfural (Haghighi Mood et al., 2013; Achinas & Euverink, 2016).

### 2.3.3. Lenhina

A lenhina é um heteropolímero aromático complexo, amorfo e mononuclear, composto por unidades de fenilpropano unidas, numa estrutura tridimensional, e que orientam as microfibrilhas da celulose, conferindo resistência mecânica aos tecidos da matéria-prima. Os monómeros de fenilpropano encontram-se unidos por diferentes tipos de ligações, como ligações éter (C-O-C) e ligações carbono-carbono (C-C). A lenhina é formada pela polimerização dos álcoois precursores, p-cumarílico, coniferílico e sinapílico, que diferem entre si pelo seu grau de metoxilação (figura 2.6) (Pedro, 2013; Isabel, 2014).

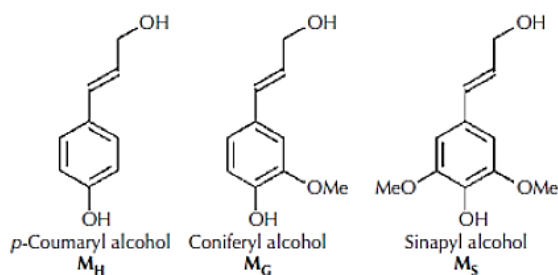


Figura 2.6 - Álcoois precursores da lenhina, *p*-cumarílico (MH), coniferílico (MG) e sinapílico (MS) (adaptado de Sun, 2010).

A principal função da lenhina é fornecer suporte estrutural, impermeabilidade e resistência a ataques microbiológicos e “stress” oxidativo. Este heteropolímero é também insolúvel em água.

#### 2.4. Valorização energética de materiais lenhocelulósicos para produção de biocombustíveis

Os materiais lenhocelulósicos têm vindo a ser utilizados na produção de biocombustíveis sólidos de forma a reduzir a utilização direta de espécies florestais no setor da produção de “pellets” e “briquetts” (Gentil & Vale, 2015). No entanto esta aplicação só é viável quando os materiais lenhocelulósicos não apresentam contaminações relevantes que afetem significativamente os critérios de qualidade para biocombustíveis sólidos.

No caso de materiais com alguma contaminação significativa podem utilizar-se tecnologias de conversão mais complexas que permitem transformar estes materiais noutros combustíveis eliminando no processo componentes indesejáveis.

A partir de materiais lenhocelulósicos, podem obter-se diversos biocombustíveis gasosos ou líquidos tais como biogás, gás de síntese, biohidrogénio, bioetanol, outros bioalcoóis, entre outros. Na tabela 2.6 são apresentados alguns biocombustíveis gasosos e líquidos, bem como respetivas características.

Tabela 2.6 - Caracterização de alguns biocombustíveis gasosos e líquidos.

Biocombustível	Caracterização
Biogás	Produzido a partir de fermentação anaeróbia de matéria orgânica. Para ter utilização como biocombustível é necessário que seja purificado até atingir a qualidade do gás natural. Maioritariamente constituído por metano e dióxido de carbono, além de vestígios de ácido sulfídrico, amoníaco, azoto, entre outros.
Gás-síntese (“syngas”)	Mistura de gases, resultante de processos de limpeza e condicionamento do gás-produto obtido na gaseificação da biomassa. Apresenta na sua composição monóxido de carbono, hidrogénio, água, dióxido de carbono, entre outros.
Biohidrogénio	Hidrogénio produzido a partir de biomassa e/ou da fração biodegradável de resíduos.
Bioetanol (C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> O)	Produzido a partir de biomassa (culturas ricas em amido, açúcares ou materiais lenhocelulósicos), e/ou a partir da fração biodegradável de resíduos.
Biobutanol (C <sub>4</sub> H <sub>10</sub> O)	Butanol produzido a partir de biomassa. Apresenta poder calorífico superior ao bioetanol e pode ser utilizado como aditivo quer ao gásóleo quer à gasolina.
Bio-óleo	Óleo produzido essencialmente a partir de substâncias de origem vegetal e animal quando estas são submetidas ao processo de pirólise. Tem principal utilização enquanto combustível para aquecimento e produção de energia elétrica.

Fontes: adaptado da Diretiva 2003/30/CE; Wang et al. 2009.

A utilização de materiais lenhocelulósicos e em particular de resíduos destes materiais na produção de biocombustíveis líquidos contribui para reduzir a sua pegada de carbono e aumentar a sua sustentabilidade, na medida em que não se utilizam matérias-primas dedicadas e que podem competir com o setor alimentar (Diretiva 2009/28/CE).

#### 2.4.1. Benefícios ambientais e socioeconómicos dos biocombustíveis

Os biocombustíveis ganham cada vez mais peso no quadro energético global, devido aos benefícios que apresentam a nível ambiental, económico e social (tabela 2.7) (Ayhan Demirbas, 2009). A sua utilização contribui para a estabilização da concentração de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) na atmosfera, através do “fecho” do ciclo de carbono, contribuindo assim para a redução do aquecimento global. Além disso, estão disponíveis a partir de matérias-primas relativamente comuns a nível global, o que contribui para uma maior segurança energética comparativamente aos combustíveis fósseis. Deste modo, é possível afirmar que os biocombustíveis são uma importante fonte de energia tanto nos países desenvolvidos como em desenvolvimento (Escobar et al., 2009).

Tabela 2.7 - Principais benefícios ambientais e socioeconômicos resultantes da produção e utilização de biocombustíveis.

<b>Impactos ambientais</b>	<b>Impactos socioeconômicos</b>
Redução de gases com efeito de estufa	Crescimento de emprego
Redução da poluição do ar	Diversidade de combustíveis
Biodegradabilidade	Desenvolvimento da agricultura
Eficiência em motores de combustão	Maior independência na importação de petróleo
Sequestro de carbono	Maior segurança energética
Renovabilidade	Competitividade internacional
Menor uso de combustíveis fósseis	

Fonte: adaptado de Demirbas, 2009

Ao nível de emissões de poluentes, as quantidades emitidas de GEE dependem do tipo de biocombustível, isto é, do tipo de matéria-prima utilizada e do processo de produção. Os biocombustíveis convencionais não prometem uma melhoria significativa na mitigação de GEE (para alguns casos apresentam até uma gama de emissões de GEE mais ampla e elevada que alguns combustíveis fósseis – como o bioetanol produzido através de milho). Por outro lado, os biocombustíveis de 2ª geração exibem um menor potencial de emissões de CO<sub>2</sub> equivalente por unidade de energia produzida, não só em comparação com os combustíveis fósseis, mas também em relação aos biocombustíveis de 1ª geração.

Para além das emissões de gases poluentes, existem ainda outros aspetos relevantes na avaliação de sustentabilidade entre os diversos tipos de combustíveis. O cultivo de matérias-primas para produção de biocombustíveis tem um impacto negativo ao nível do solo e da água, provocando acidificação (devido à fertilização química e à combustão da biomassa) e eutrofização (devido aos fertilizantes químicos), sendo estas consequências mais significativas no quadro das culturas alimentares (1ª geração). Destas consequências surgem outros impactos ambientais, como ecotoxicidade terrestre e de águas superficiais, assim como toxicidade humana. A utilização de biomassa lenhocelulósica poderá resultar numa maior produção de biocombustível por unidade de superfície utilizada, exigindo uma menor quantidade de fertilizantes químicos e menor consumo de energia na sua produção.

Relativamente às instalações industriais, as refinarias de petróleo têm um impacto negativo bastante significativo relativamente aos recursos hídricos (superficiais e subterrâneos), devido à elevada quantidade de água residual contaminada com impurezas (como metais pesados, sulfuretos e fenóis), assim como os compostos tóxicos resultantes do processo de refinação, como cianina, dioxinas e furanos. Os impactos ambientais negativos manifestam-se também nas emissões de poluentes gasosos e na geração de resíduos sólidos perigosos.

Em comparação, as biorefinarias têm impactos ambientais menos relevantes a nível local, principalmente devido à menor quantidade de subprodutos tóxicos. No entanto, os processos

albergados nestas instalações apresentam um maior consumo de água, especialmente no que diz respeito às biomassas necessárias à 1ª geração de biocombustíveis (considerando os impactos associados à produção das matérias-primas). As águas residuais das biorefinarias contêm elevadas quantidades de compostos tóxicos (como fenóis), compostos orgânicos e nutrientes, o que altera os ecossistemas aquáticos, no sentido em que provoca o aumento da presença de algas, o que por sua vez conduz à diminuição dos níveis de oxigénio com consequências para a restante biologia aquática (Centi, Lanzafame, & Perathoner, 2011).

#### **2.4.2. Sustentabilidade dos processos de produção de biocombustíveis**

Os biocombustíveis são classificados como de 1ª, 2ª ou 3ª geração, dependendo do tipo de matéria-prima, das tecnologias de conversão utilizadas e do seu impacto ambiental e socioeconómico.

A biomassa passível de ser transformada energeticamente é caracterizada consoante a sua origem, nomeadamente se é produzida especialmente para fins energéticos (produção dedicada) ou se resulta de atividades industriais, agrícolas ou florestais, apresentando-se na forma de resíduos ou de subprodutos. Apresentam-se de seguida as características que definem cada geração de biocombustíveis, evidenciando as matérias-primas e tecnologias associadas a cada uma, bem como alguns aspetos comparativos e principais países produtores.

##### **2.4.2.1. Primeira geração**

Os biocombustíveis conhecidos como de primeira geração são produzidos a partir culturas alimentares, como o milho, o trigo, a batata, a cana-de-açúcar, sementes de soja, entre outros. Estas culturas ricas em amido, açúcar e óleo são relativamente fáceis de converter em biocombustíveis, como o bioetanol (através da fermentação), o biodiesel (por transesterificação) ou o biogás (por digestão anaeróbia).

Nos últimos anos, os países que mais se destacaram na produção destes biocombustíveis foram os Estados Unidos e o Brasil, na produção de etanol de milho e de cana-de-açúcar, respetivamente (UNCTAD, 2016; Sims et al., 2008). Segundo um relatório das Nações Unidas, foram globalmente produzidos, em 2014, cerca de 90 mil milhões de litros de bioetanol e 30 mil milhões de biodiesel (UNCTAD, 2016).

No entanto, a prática de culturas energéticas para produção de biocombustíveis gera algumas preocupações a nível da biodiversidade e do uso de água potável e de terra arável, uma vez que entra em competição com a indústria alimentar, tanto humana como animal. Este antagonismo entre biocombustíveis e bens alimentares é uma das causas para o aumento de preço dos alimentos, já que deste modo, a área disponível para culturas alimentares diminui

(Aro, 2016). Além destes fatores, esta geração requer elevados custos de produção e processamento, obrigando a subsídios governamentais, para que possam competir no mercado com os combustíveis derivados de petróleo (Aro, 2016; Suganya, Varman, Masjuki, & Renganathan, 2016).

#### 2.4.2.2. Segunda geração

Os biocombustíveis de segunda geração envolvem tecnologias de conversão avançada, não abrangendo matérias-primas alimentares. São produzidos a partir da celulose, hemiceluloses e lenhina encontradas em matérias-primas lenhocelulósicas, como a madeira, resíduos sólidos urbanos e resíduos lenhocelulósicos provenientes de atividades industriais, florestais ou agrícolas, como palha de trigo, milho, arroz, bagaço de cana-de-açúcar. As culturas florestais tipicamente utilizadas nesta geração são de ciclo curto (como choupo, eucalipto e salgueiro), além de gramíneas perenes (*miscanthus*, “switchgrass”, capim amarelo) (Naik, Goud, Rout, & Dalai, 2010; Scheper T. & Olsson L., 1979).

Perante esta grande variedade de matérias-primas, onde se incluem não só culturas mas também resíduos e subprodutos, considera-se que a produção de biocombustíveis de segunda geração constitui uma forma de reaproveitamento de resíduos orgânicos e de utilização de terrenos cujo solo não se adequa a culturas alimentares, diminuindo índices de destruição de biodiversidade, acidificação e eutrofização, muitas vezes verificados na primeira geração (Eisentraut, 2010). Outra grande vantagem no aproveitamento destes materiais é a sua abundância, renovabilidade e a baixa quantidade/variedade de utilização que normalmente têm, o que os torna mais baratos que as culturas alimentares (Anubhuti Gupta & Verma, 2015; Kuhad, Gupta, Khasa, & Singh, 2010). Em comparação com os de primeira geração, os combustíveis lenhocelulósicos apresentam um leque de matérias-primas mais variado e com maior índice energético ( $\text{GJ} \cdot \text{ha}^{-1}$ ), permitem uma maior disponibilidade de terra arável para cultivo de bens alimentares (não aumentando o seu preço) e promovem o crescimento rural, melhorando as condições económicas de regiões em desenvolvimento (OECD/IEA, 2010).

A produção de biocombustíveis lenhocelulósicos é conseguida por via bioquímica ou por via termoquímica. Na primeira, onde é exemplo o etanol celulósico, a celulose e hemiceluloses presentes na matéria-prima são convertidas em açúcares (hidrólise ácida ou enzimática) antes destes serem convertidos em álcool (fermentação). Na via termoquímica, são realizados processos de pirólise, gaseificação e/ou síntese de Fischer-Tropsch, para dar origem a bio-óleos (pirólise), gás-síntese (por gaseificação da biomassa carbonada) ou gás-óleo de Fischer-Tropsch (onde o gás-síntese é convertido no hidrocarboneto de cadeia longa, através de uma série de reações) (Sims et al., 2008). O bioetanol pode ser usado em conjunto com gasolina, sendo utilizado como combustível único nos veículos de combustível duplo, enquanto o gás-óleo de Fischer-Tropsch é um substituto total do gás-óleo de origem fóssil (Naik et al., 2010).



De acordo com um relatório das Nações Unidas, é esperado, entre 2014 e 2020, um crescimento de 50% no mercado de biocombustíveis de segunda geração, sendo que atualmente os Estados Unidos detêm 35% da capacidade total de produção destes biocombustíveis, seguidos pela China (24%), Canadá (22%), União Europeia e Brasil (ambos com 9%) (UNCTAD, 2016).

A conversão de biomassa lenhocelulósica em açúcares facilmente fermentáveis é um processo complexo e dispendioso, visto que envolve pré-tratamentos físicos e químicos, pelo que esta segunda geração ainda não é economicamente viável em larga escala (Dragone, 2010). Para a uma redução de custos e utilização à escala industrial alguns fatores devem ser melhorados, como o uso total de subprodutos, assim como a realização de estudos mais completos e detalhados sobre o assunto (Lofrano, 2013). Além disso, é necessário ter em conta que o uso de resíduos primários passíveis de serem usados para produção de biocombustíveis, como talos de milho e palha de arroz poderiam ser usados como forragem ou deixados no terreno como matéria-orgânica. Isto significa que o uso destes resíduos agrícolas e florestais na produção de biocombustíveis podem levar a custos adicionais para alimentação animal e/ou para se alcançar uma melhor qualidade de nutrientes no solo (Eisentraut, 2010). De um modo geral, os benefícios ambientais da segunda geração de biocombustíveis dependem da eficiência e sustentabilidade de toda a cadeia de processamento e produção. Assim, é importante atingir um fornecimento de energia sustentável, através de uma organização e provisionamento eficientes do tipo de matéria-prima (Ayhan Demirbas, 2008).

#### **2.4.2.3. Terceira geração**

Enquanto a segunda geração intervém na área da conversão de biomassa, a terceira geração é focada na produção desta, ou seja, aborda matérias-primas que não fazem uso intensivo de solos, nomeadamente microalgas ou cianobactérias (IEA, 2008).

As microalgas são microrganismos que têm como função converter a luz solar, azoto, fósforo e outros sais minerais, água e CO<sub>2</sub> em biomassa (lípidos, proteínas e hidratos de carbono), o que as torna especialmente aptas para mitigação de CO<sub>2</sub>. Podem ter utilização direta (combustão para geração de eletricidade, uso como alimento animal ou como fertilizante) ou seguir via química, termoquímica ou bioquímica. Na primeira ocorre produção de biodiesel através do processo de transesterificação. Na segunda via, há produção de gás-síntese (por gaseificação) ou bio-óleos (por pirólise ou liquefação hidrotérmica), enquanto pela via bioquímica, se podem obter bioálcoois (fermentação) ou biohidrogénio (a partir da produção fotossintética ou através do processo de digestão anaeróbia) (Dragone, Fernandes, Vicente, & Teixeira, 2010; Suganya et al., 2016).

As principais vantagens das microalgas refletem-se na sua elevada produtividade (L.ha<sup>-1</sup>), curta taxa de crescimento e de colheita e no facto de poderem ser cultivadas em águas não aptas

para irrigação ou consumo humano, necessitando de pouca manutenção (Demirbas & Fatih Demirbas, 2011; Demirbas, 2011). Contudo, relativamente à produção de biocombustíveis, a utilização de microalgas à escala industrial, comparando com rendimentos conseguidos com outras biomassas, não é totalmente viável visto que o sucesso de toda a produção e colheita destes microrganismos depende do sistema de cultivo, que obriga a elevados custos energéticos, traduzindo-se em elevados investimentos financeiros (Gris, Trierweiler, & Farenzena, 2011). Além destas questões, também o abastecimento de microalgas em instalações de aquacultura pode constituir um problema, visto que se o seu fornecimento for interrompido, toda a cadeia trófica presente na lagoa/reator pode ficar comprometida constituindo assim elevados prejuízos financeiros (Suganya et al., 2016).

Finalmente, os processos industriais de produção de biocombustíveis a partir de biomassa só se podem considerar sustentáveis se a matéria-prima utilizada existir em quantidades suficientes e renováveis durante o tempo de vida expectável da instalação industrial.

#### **2.4.3. Promoção de biocombustíveis a nível europeu e nacional**

A utilização de biocombustíveis nos transportes europeus foi promovida pela Diretiva 2003/30/CE do Parlamento Europeu e do Conselho, de 8 de maio. Este documento tinha como principal objetivo a eleição de biocombustíveis e de outros combustíveis renováveis para efeitos de transporte em cada Estado-Membro, em substituição da gasolina e do gasóleo (Parlamento Europeu e do Conselho, 2003). De um modo geral, pretendia-se contribuir para o cumprimento de objetivos estatuidos relativamente às alterações climáticas (como estabelecido no Protocolo de Quioto), à segurança do aprovisionamento e à promoção de fontes de energia renováveis (artigo 1.º). A presente Diretiva definiu ainda, para todos os Estados-Membros, uma quota de 5,75% de biocombustíveis em teor energético, em opção à gasolina e gasóleo utilizados para transporte, até 2010 (artigo 3º).

Não obstante, a referida Diretiva é alterada e, subsequentemente, revogada pela Diretiva 2009/28/CE do Parlamento Europeu e do Conselho, de 23 de abril, que se insere no quadro da Política Energética Europeia, especificamente ao nível da promoção de energia proveniente de fontes renováveis (Parlamento Europeu e do Conselho, 2009). Neste documento são estabelecidos objetivos nacionais obrigatórios para a quota global de energia renovável no consumo final bruto e para a consumida nos transportes, fixam-se regras relativas às transferências estatísticas e projetos comuns entre EM e ainda se impõem importantes critérios de sustentabilidade para os biocombustíveis e biolíquidos (artigo 1.º). Esta Diretiva veio certificar o objetivo obrigatório mínimo de 10%, imposto a todos os EM, para a quota de biocombustíveis consumida no setor dos transportes até 2020 (artigo 3.º). Afirma também que este objetivo deve ser definido como a quota de energia final que deverá ser consumida pelo setor dos transportes a partir do conjunto das fontes renováveis, e não apenas a partir de biocombustíveis.

A Diretiva (EU) 2015/1513 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 9 de setembro, que altera as já referidas Diretivas de 1998 e de 2009 (relativa à promoção da utilização de energia renovável), tem como principais objetivos estabelecer um quadro comum entre os EM para promoção de energia proveniente de fontes renováveis, fixar objetivos nacionais obrigatórios para a quota global dessa energia (incluindo a fração consumida pelos transportes) e reforçar a importância de critérios de sustentabilidade para os biocombustíveis e biolíquidos (Parlamento Europeu e do Conselho, 2015). Nesse sentido, estipula uma meta opcional de 0,5% na quota de energia renovável em todas as formas de transporte, em 2020, a cumprir com biocombustíveis avançados – dos quais fazem parte os materiais lenhocelulósicos (artigo 2.º - 2e). Os EM produtores de biocombustíveis avançados são ainda beneficiados com dupla contagem do seu valor energético, sendo esta uma maneira de incentivar a utilização de biocombustíveis avançados, promovendo assim um desenvolvimento sustentável e a proteção de solos aráveis e disponíveis para culturas alimentares (artigo 2.º- 2f).

Atualmente, e tendo em conta os princípios defendidos sobre sustentabilidade nas últimas duas Diretivas referidas, a Comissão Europeia e o Parlamento e os Estados-Membros concordaram em conjunto em limitar em 7% o uso de biocombustíveis de primeira geração (culturas agroalimentares).

Em Portugal, a utilização de biocombustíveis nos transportes rodoviários é promovida no âmbito da estratégia da União Europeia para a redução de emissão de gases com efeito estufa, (de acordo com os compromissos assumidos no Protocolo de Quioto).

O Decreto-Lei nº 62/2006, de 21 de março, transpõe para a ordem jurídica nacional a Diretiva 2003/30/CE e insere-se na referida estratégia delineando que, até 2020, se consiga a substituição de 20% dos combustíveis derivados do petróleo no transporte rodoviário por biocombustíveis ou combustíveis alternativos (Ministério da Economia e da Inovação, 2006a). Contudo, o mercado de biocombustíveis ainda não é competitivo, visto que os custos inerentes à sua produção são mais elevados que os derivados do petróleo, nomeadamente a gasolina e o gasóleo. Com isto, de modo a assegurar o cumprimento dos compromissos assumidos no Protocolo de Quioto, o Decreto-Lei nº 66/2006, de 22 de Março, altera o Código dos Impostos Especiais de Consumo (CIEC), aditando os artigos 71.º- A e 78.º- A, nos quais se estabelece uma isenção, total ou parcial, aos biocombustíveis puros ou incorporados na gasolina ou no gasóleo (Ministério da Economia e da Inovação, 2006b).

O Decreto-Lei n.º 117/2010, de 25 de Outubro, que transpõe para a ordem jurídica interna os artigos 17.º a 19.º e os anexos III e V da Diretiva n.º 2009/28/CE, do Conselho e do Parlamento Europeu, de 23 de Abril, estabelece os critérios de sustentabilidade para a produção e utilização de biocombustíveis assim como os limites de incorporação obrigatória de

biocombustíveis de 2011 a 2020, em Portugal (Ministério da Economia da Inovação e do Desenvolvimento, 2015) (tabela 2.8).

Tabela 2.8 - Teores de incorporação de biocombustíveis, em teor energético, em Portugal, para o setor dos transportes, apresentados no Decreto-Lei n.º 117/2010.

Anos	Meta de incorporação (%)
2011 e 2012	5,0
2013 e 2014	5,5
2015 e 2016	7,5
2017 e 2018	9,0
2019 e 2020	10,0

#### 2.4.4. Bioetanol

O bioetanol ( $C_2H_6O$ ) é um biocombustível líquido produzido a partir de biomassa. Apresenta-se como uma fonte de energia promissora, sendo o biocombustível mais utilizado no mundo para utilização em transportes, sem competidor próximo (Fatih Demirbas, Balat, & Balat, 2011).

Existe uma grande variedade de tecnologias de conversão e matérias-primas que podem ser usadas para a sua produção, tal como cereais (culturas ricas em amido, como o milho, cevada ou a batata), matérias ricas em açúcar (cana-de-açúcar, melaços), fontes de celulose (biomassa lenhocelulósica, resíduos sólidos urbanos, resíduos lenhocelulósicos), microalgas, entre outros.

Enquanto combustível, o bioetanol pode ser utilizado em duas diferentes circunstâncias. O primeiro caso é a sua utilização em veículos convencionais, isto é, sem modificações adicionais nos motores, nos quais pode ser misturado com gasolina (tipicamente entre 5 a 20% etanol). A segunda opção consiste em utilizar etanol em veículos com motores adaptados (entre 85 a 100%). Nos EUA tem sido usada a combinação E10 (10% bioetanol e 90% gasolina), podendo chegar-se a elevadas concentrações, como E85, como aplicado nos veículos FFV (Mansouri et al. 2016). Para além dos EUA, outros países têm utilizado bioetanol em complemento com a gasolina, como é o caso do Canadá (E10 e FFV E85), Suécia (E5 e FFV E85), Índia (E5), Austrália (E10), Tailândia (E10), China (E10), Colômbia (E10), Peru (E10), Paraguai (E7) ou Brasil (E20, E25 e FFV para qualquer concentração) (Moreira, Feijoo, & Gonza, 2010).

Em comparação com a gasolina ou com o gasóleo, o bioetanol apresenta maior número de octanas, limites de inflamabilidade mais amplos e maior calor latente de vaporização, o que lhe fornece uma maior taxa de compressão com um menor tempo de queima conduzindo a, teoricamente, uma maior eficiência num motor de circuito integrado (Adekunle, Orsat, & Raghavan, 2016). Além disto, o etanol é um combustível oxigenado que contém 35% de oxigénio, o que reduz a quantidade emitida de partículas, hidrocarbonetos, CO e NOx durante

a combustão, melhorando a sua eficiência (Balat, Balat, & Öz, 2008). As desvantagens do bioetanol incluem um menor poder calorífico e menor pressão de vapor em comparação com os combustíveis fósseis, além de corrosividade, toxicidade para os ecossistemas e miscibilidade com água (pode constituir um problema em motores de combustão interna, pelo que é obrigatório manter o etanol no estado anidro) (Achinas & Euverink, 2016; Fatih Demirbas et al., 2011). Na tabela 2.9 comparam-se algumas características entre o etanol e outros combustíveis.

Tabela 2.9 - Características de combustíveis líquidos comuns.

	<b>Etanol</b>	<b>Metanol</b>	<b>Biodiesel (FAME<sup>1</sup>)</b>	<b>Gasóleo</b>	<b>Gasolina</b>
<b>Densidade (kg.m<sup>-3</sup>) (a 15°C)</b>	789	790	860 - 900	820 - 860	720 - 780
<b>Poder Calorífico Inferior (MJ.kg<sup>-1</sup>)</b>	27	20	37	43	43
<b>Número de cetano</b>	5 - 8	3,8 - 5	47 - 65	40-52	N/A
<b>Número de octanas (RON)<sup>2</sup></b>	100 - 113	100 - 114	N/A	N/A	85 - 105
<b>Temperatura autoignição (°C)</b>	330 - 420	463	315	250	260 - 370

Fontes: Bae & Kim, 2016; Balat et al., 2008; Mansouri, Rihani, Laoufi, & Özkan, 2016; NS Mosier, Ladisch, & Ladisch, 2002; U.S Department of Energy, 2014; Vallinayagam, Vedharaj, Yang, Roberts, & Dibble, 2015.

#### 2.4.4.1. Evolução do bioetanol enquanto biocombustível

No século XIX, foram criados os primeiros motores a álcool. Nos EUA, Samuel Morey desenvolveu um motor a etanol e terebintina, enquanto, na Alemanha, o inventor Nicholas Otto usou o mesmo álcool num dos seus motores. Ainda nos finais deste século, Henry Ford constrói o primeiro automóvel com funcionamento a etanol puro (Sheehan, 1998).

No final da primeira grande guerra, no início dos anos 20, a gasolina torna-se o combustível mais popular nos EUA, assim como noutras partes do mundo. No entanto, começa-se a adicionar este combustível a etanol, com o intuito de aumentar o número de octanas e assim elevar a resistência às “pancadas” quando o combustível é queimado na faísca de ignição do motor (“engine knocking”) (Baird, 1989). Na mesma altura, o Brasil começa a desenvolver o seu mercado automóvel, pelo que recorre às suas plantações de cana-de-açúcar para utilizar bioetanol enquanto combustível.

Na década de 70, durante a primeira crise de combustível, é criado naquele país o Programa Nacional do Álcool, para promoção de bioetanol enquanto combustível. A partir deste

<sup>1</sup> FAME = “Fatty acid methyl esters” (éster metílico de ácidos gordos)

<sup>2</sup> RON = “Research octane number”.

momento, as combinações deste biocombustível com gasolina (E10 e E25) têm sido essenciais até aos dias de hoje. Para além das referidas combinações, existem, no Brasil atual, ainda automóveis FFV, capazes de utilizar apenas bioetanol (E100) (Pacini, 2015). Enquanto no Brasil, a principal matéria-prima utilizada para produção de bioetanol é a cana-de-açúcar, nos EUA o milho é a cultura eleita. Entre 1979 e 1986 a produção norte-americana de bioetanol aumentou drasticamente, passando de 75 milhões de litros para 2,84 mil milhões de litros, devido ao facto de o Congresso Americano ter colocado embargos no fornecimento de gasolina vinda de outros países, pelo que o interesse no bioetanol como combustível alternativo se fortaleceu (Ethanol History, 2017).

#### 2.4.4.2. Panorama mundial atual

O bioetanol é o biocombustível mais produzido a nível mundial, tendo a sua produção aumentado significativamente, quase se duplicando entre 2007 e 2015 (figura 2.7), esperando-se atingir cerca de 135 mil milhões de litros produzidos em 2024 (OECD/FAO, 2015).

Atualmente, os EUA são o maior produtor mundial de bioetanol, responsável por cerca de 58% da produção mundial em 2015 (Wilson et al., 2016). Esta escala de produção deve-se às plantações de milho, localizadas no “Corn Belt”, na região centro-oeste do país. A produção de bioetanol a partir da cultura de milho é limitada na maioria dos países, sendo que já foi utilizada pela China. Apenas o Canadá e a Argentina têm revelado interesse em desenvolver futuros planos neste campo (M. Guo, Song, & Buhain, 2015; Koizumi, 2015). O Brasil é o segundo maior produtor mundial de bioetanol, responsável por cerca de 28% da produção global, em 2015 (Wilson et al., 2016). Este país serve-se dos seus 9 M de hectares cultivados com cana-de-açúcar para se colocar nesta posição, enquanto o trigo e a cevada são as culturas utilizadas pela União Europeia, responsável por cerca de 5% da produção mundial de bioetanol, em 2015 (Koçar & Civaş 2013; UNCTAD, 2016).

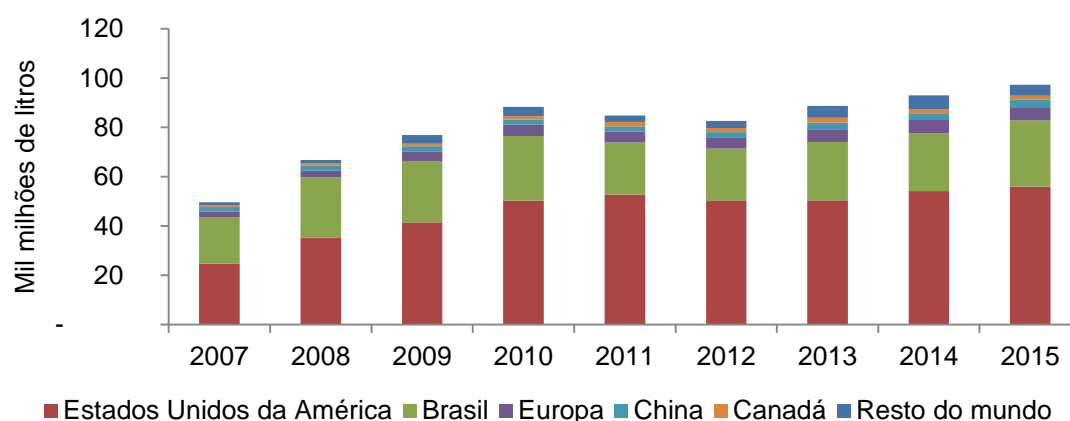


Figura 2.7 - Produção global de etanol por país/região (adaptado de US Department of Energy, 2017).

Dentro da variedade de matérias-primas passíveis de serem convertidas em bioetanol, há a distinção entre biomassa celulósica (culturas florestais, gramíneas, resíduos de madeira, entre outros) e biomassa agrícola (milho, batata, trigo, beterraba sacarina, mandioca, cevada, sorgo). Estes dois grupos diferem na composição física e química, sendo que o primeiro é estruturalmente mais forte e denso, apresentando portanto um maior teor de lenhina, sendo mais recalcitrante à ação de enzimas, atingindo baixos rendimentos na hidrólise enzimática (cerca de 40%) (Zhu & Pan, 2010). Estes fatores acentuam-se na madeira de plantas gimnospermicas, como é o caso da madeira de pinho. Relativamente a este grupo de plantas, as mesmas apresentam um menor conteúdo em pentoses do que as matérias-primas agrícolas, o que é favorável à produção em bioetanol. A conversão deste tipo de monómeros obriga a custos adicionais, dado que as leveduras utilizadas para fermentação das pentoses (por exemplo, *Pichia stipitis* (*Scheffersomyces stipitis*) ou *Candida shehatae*) atingem rendimentos mais baixos em comparação com as que fermentam glucose (hexose) (exemplificando, *Saccharomyces cerevisiae*) (Ashutosh Gupta et al., 2014; Mohd Azhar et al., 2017; Njoku, Iversen, Uellendahl, & Ahring, 2013). Além disso, a recuperação de pentoses é baixa, devido à sua decomposição em furfural (inibidor da fermentação, que se forma durante uma hidrólise extensa) (Zhu & Pan, 2010). Como produto final, o bioetanol produzido é indistinguível, não existindo diferenças em termos de rendimento enquanto combustível. No entanto, segundo o Departamento de Energia dos Estados Unidos, o etanol produzido a partir de milho produz cerca de 26% de energia a mais do que aquela que é necessária para o produzir, enquanto o etanol celulósico produz cerca de 80% de energia excedente. Além disto, enquanto o etanol convencional (culturas agrícolas) reduz os GEE entre 10 a 20%, em comparação com a gasolina, o celulósico reduz em mais de 80% (Montenegro, 2006). É com base nestes factos e nas análises anuais entre 2008 e 2017, que o mesmo departamento prevê, a longo prazo, a sobreposição do etanol celulósico ao convencional (figura 2.8).



Figura 2.8 - Produtividade anual de etanol amiláceo e celulósico por ano (valores posteriores a 2017 correspondem a estimativas efetuadas com base no modelo de desenvolvimento atual). (adaptado de US Department of Energy, 2017).

#### **2.4.4.3. Indústrias mundiais produtoras de bioetanol celulósico**

A contínua pesquisa em torno do etanol celulósico tem levado a grandes investimentos financeiros para projetos que envolvem atividades como desenvolvimento de indústrias, estudo de enzimas, novos processos de produção, desenvolvimento de culturas ou aproveitamento da lenhina - um subproduto da conversão lenhocelulósica (European Technology and Innovation Platform, 2017).

A tabela 2.10 apresenta, de forma sumarizada, as principais indústrias localizadas na América do Norte (EUA e Canadá) envolvidas no desenvolvimento de etanol celulósico. Excluíram-se as indústrias atualmente desativadas.



Tabela 2.10 - Indústrias norte-americanas e canadenses atualmente envolvidas na produção e desenvolvimento de etanol celulósico.

País	Indústria	Tipo biomassa	Capacidade (M litros.ano <sup>-1</sup> ) (aprox.)
Estados Unidos da América	<b>Em atividade</b>		
	DuPont Cellulosic Ethanol LLC - Nevada	Resíduo de colheira	114
	Poet-DSM Advanced Biofuels LLC - Project Liberty		76
	Quad County Cellulosic Ethanol Plant	Milho	8
	Fiberight Demonstration Plant	Fluxo de resíduos	2
	ICM Inc. Pilot Integrated Cellulosic Biorefinery	Culturas energéticas	1
	ZeaChem Inc. - Demonstration Plant		1
	American Process Inc. - Thomaston Biorefinery	Outros	1
	<b>Propostas</b>		
	Tama Renewable Energy Campus LLC	Milho	379
	ICM Element cellulosic ethanol		19
	BlueFire Renewables Fulton LLC - Ethanol	Biomassa lenho-celulósica	68
	Lanzatech Freedom Pines Biorefinery LLC		8
	Chemtex Project Alpha - Carolina Cellulosic Biofuels	Culturas energéticas	76
	ZeaChem Boardman Biorefinery LLC		95
	Enerkem Mississippi Biofuels LLC	Outros	38
	Fiberight of Blairstown LLC	Fluxo de resíduos	23
Canadá	<b>Em atividade</b>		
	Enerkem Alberta Biofuels LP	Outros	144
	Enerkem Inc.-Westbury	Biomassa lenho-celulósica	19
	Woodland Biofuels Inc. - Demonstration Plant		8
	Iogen Corporation	Culturas energéticas	8
	<b>Propostas</b>		
	Enerkem/GreenField - Vanerco	Fluxo de resíduos	144
	Woodland Biofuels Inc. - Welland	Biomassa lenho-celulósica	299

Fonte: Ethanol Producer Magazine, 2017

Identificam-se, portanto, na América do Norte, um total de 11 indústrias em atividade, com uma capacidade total de 382 milhões de litros anuais, a adicionar às restantes 10 indústrias em processo de desenvolvimento, numa capacidade de produção total de cerca de 1,53 mil milhões de litros anuais.

Na Europa estão ainda em desenvolvimento outras indústrias de etanol celulósico à escala comercial (tabela 2.11).

Tabela 2.11 - Principais indústrias de etanol celulósico na Europa.

País	Indústria	Matéria-prima
	Biogasol	
Dinamarca	Ensted-værket	Palha de trigo
	Inbicon	
Itália	Mossi & Ghisolfi Group	Palha de trigo e <i>Arundo donax</i>
Espanha	Abengoa	
Suécia	Sekab	
Alemanha	Lesaffre	Outros
Noruega	Weyland	

Fontes: Abengoa, 2017; Biofuelsdigest, 2010; Biogasol, 2017; Dong energy, 2016; ETIP Bioenergy, 2017; Inbicon, 2017; Lesaffre, 2017; Mossi Ghisolfi Group, 2017; Sekab, 2017

Existem ainda outras indústrias internacionais envolvidas no desenvolvimento de etanol celulósico como a GranBio (Brasil, com capacidade de 82 M litros.ano<sup>-1</sup>), Fuyang (China), Toyota Motor Corporation (Japão, com 0,25 M litros.ano<sup>-1</sup>), Honda Motor (Japão), além da Kirov Biochemical Works (Rússia).

#### 2.4.5. Conversão de biomassa lenhocelulósica em bioetanol

A conversão de diferentes matérias-primas lenhocelulósicas em bioetanol oferece inúmeros benefícios, mas o seu desenvolvimento é ainda dificultado por obstáculos técnicos e económicos. Neste contexto, alguns dos mais importantes fatores para conseguir uma redução do custo inerente à produção de bioetanol são uma eficiente utilização das matérias-primas, elevada produtividade, elevada concentração de bioetanol e uma integração de processos tal que atinja a mínima necessidade de energia (Alvira, Tomás-Pejó, Ballesteros, & Negro, 2010).

A produção de bioetanol a partir de biomassa lenhocelulósica compreende quatro principais operações: pré-tratamento para libertar a celulose e hemiceluloses; hidrólise de celulose e hemiceluloses para produção de açúcares passíveis de sofrerem fermentação, como a glucose, xilose, arabinose, galactose e manose; fermentação de açúcares redutores; separação/purificação do produto final (Nathan Mosier, Wyman, et al., 2005; Sarkar, Ghosh, Bannerjee, & Aikat, 2012).

##### 2.4.5.1. Pré-tratamentos

O objetivo de qualquer pré-tratamento aplicado a uma biomassa lenhocelulósica é modificar a sua estrutura, macro e microscopicamente, de modo a remover ou alterar impedimentos estruturais ou composicionais (figura 2.9) (Balat et al., 2008; Nathan Mosier, Wyman, et al.,

2005) que possam limitar a etapa de hidrólise. Assim, a ação de um pré-tratamento consiste em (Gao et al., 2013; Pellerá & Gidaracos, 2017):

- Modificar ou remover a lenhina, através da quebra das suas ligações;
- Reduzir a cristalinidade e o grau de polimerização da celulose, através do rompimento da sua estrutura;
- Polimerizar ou remover as hemiceluloses;
- Aumentar a área superficial e a porosidade da biomassa de modo a que celulose fique acessível a enzimas ou ácidos que convertem os polímeros de hidratos de carbono em açúcares passíveis de sofrerem fermentação.

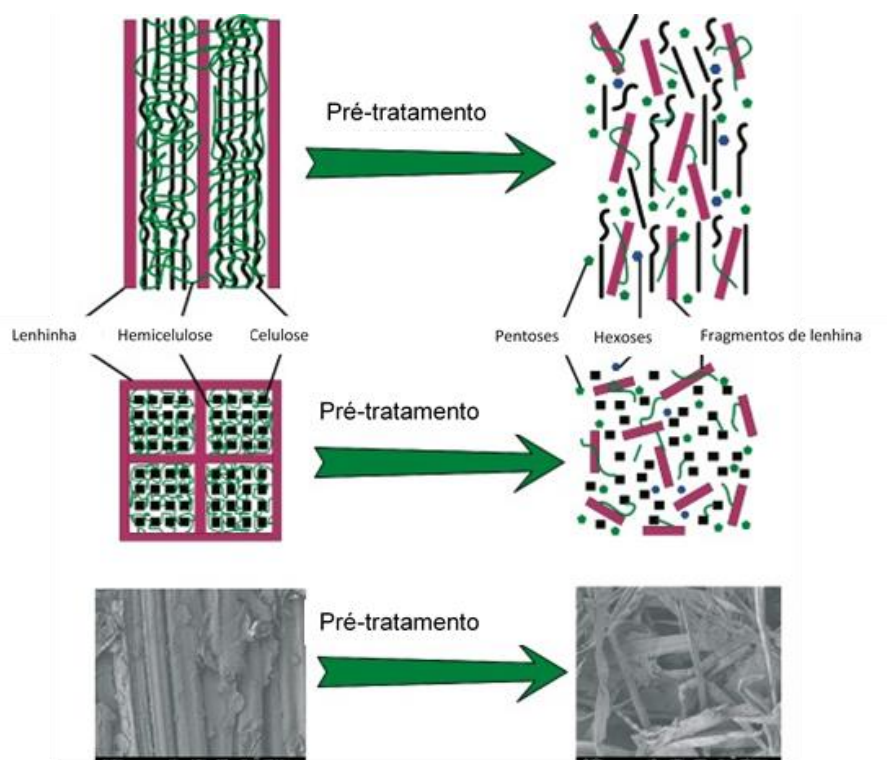


Figura 2.9 - Representação da estrutura de uma biomassa lenhocelulósica antes e depois de ser aplicado um pré-tratamento (Chapple C, Ladisch M, Meilan R, 2007).

Como já referido, as fibras da celulose são ligadas por ligações de hidrogénio intra e intermoleculares, pelo que este polissacarídeo é insolúvel em água e na maioria dos solventes orgânicos (Swatloski, Spear, Holbrey, & Rogers, 2002). Comparativamente, as hemiceluloses são mais fáceis de hidrolisar devido à sua estrutura amorfa e ramificada (com cadeias laterais curtas) e ao seu baixo peso molecular. Para aumentar a digestibilidade da celulose, grande parte ou a totalidade das hemiceluloses têm de ser removidas, uma vez que cobrem a superfície da celulose. No entanto, há que ter em conta que as hemiceluloses são relativamente sensíveis às condições de operação. Parâmetros como a temperatura e tempos de retenção têm de ser controlados no intuito de evitar a formação de produtos indesejados,

como compostos inibidores à hidrólise enzimática e fermentação (A. Demirbas, 2008; Haghighi Mood et al., 2013).

O pré-tratamento tem sido visto como uma das etapas mais onerosas na conversão de biomassa lenhocelulósica em açúcares fermentáveis. No entanto, pesquisas têm sido realizadas continuamente no sentido de reduzir os custos inerentes e desenvolver novas técnicas mantendo uma elevada eficiência (Nathan Mosier, Wyman, et al., 2005). Neste sentido, os fatores que devem ser tidos em consideração para obter um custo mínimo e rendimentos significativos no processo de pré-tratamento são indicados na tabela 2.12.

Tabela 2.12 - Fatores-chave num eficiente pré-tratamento a uma biomassa lenhocelulósica.

Fator-chave	Descrição
Adequação do pré-tratamento à matéria-prima	Alguns pré-tratamentos são mais adequados a certos tipos de biomassa do que outros. Chandra e colaboradores demonstraram que pré-tratamentos alcalinos, explosão de fibras com amoníaco [“Ammonia fiber explosion” (AFEX)] e percolação com amoníaco reciclado são mais indicados para biomassa agrícola, atingindo maiores índices de remoção de lenhina, sendo menos eficientes em biomassas florestais, dado que apresentam maior recalcitrância (Chandra et al., 2007). Por outro lado, os pré-tratamentos com ácidos têm sido eficientes numa larga variedade de substratos lenhocelulósicos (Nathan Mosier, Wyman, et al., 2005).
Elevada digestibilidade do resíduo sólido pré-tratado	A celulose que permanece no resíduo sólido após o pré-tratamento deve ser altamente digerível por enzimas (rendimento acima dos 90 %) em menos de 5 a 3 dias, com carga enzimática inferior a 10 FPU <sup>3</sup> .g <sup>-1</sup> de celulose (Yang & Wyman, 2008).
Baixa degradação de açúcares	Quanto maior a recuperação de celulose e hemiceluloses após o processo de pré-tratamento melhor (Gao et al., 2013).

<sup>3</sup> Unidades de papel de filtro [“Filter paper units” (FPU)].

(Tabela 2.12 continuação)

Mínima formação de compostos inibidores	<p>Determinadas condições durante o pré-tratamento, como longos tempos de residência, elevada temperatura e pressão, entre outras podem conduzir a uma degradação/solubilização da hemicelulose e da lenhina e gerar componentes tóxicos derivados da decomposição de açúcares que poderão afetar as etapas de hidrólise enzimática e de fermentação (Oliva et al., 2003; Pellerá &amp; Gidarakos, 2017). A sua quantidade depende do tipo de biomassa e da severidade do pré-tratamento. Os produtos de degradação gerados no pré-tratamento de materiais lenhocelulósicos dividem-se em várias categorias (Jönsson &amp; Martín, 2016):</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Derivados de furano, nomeadamente furfural (<math>C_5H_4O_2</math>) e hidroximetilfurfural (HMF) (<math>C_6H_6O_3</math>), que derivam das pentoses e hexoses geradas pela hidrólise da celulose e hemiceluloses;</li> <li>• Ácidos carboxílicos alifáticos, como: <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Ácido acético (<math>CH_3COOH</math>), originado pela hidrólise de grupos acetilo das hemiceluloses;</li> <li>○ Ácido fórmico (<math>CH_2O_2</math>), que deriva da degradação de furfural e HMF;</li> <li>○ Ácido levulínico (<math>C_5H_8O_3</math>), resultante da degradação de HMF;</li> </ul> </li> <li>• Ácidos urónicos, como ácido glucorónico (<math>C_6H_{10}O_7</math>) ou galacturónico (<math>C_6H_{10}O_7</math>);</li> <li>• Compostos fenólicos, incluindo álcoois, aldeídos e cetonas (derivados a partir da degradação da lenhina e de extrativos).</li> </ul>
Utilização de biomassas com tamanho de partícula reduzido	<p>A moagem e trituração dos materiais são processos que requerem elevados custos energéticos e tecnologias onerosas (Alvira et al., 2010). Deste modo, as tecnologias de pré-tratamento não tão exigentes como tamanho reduzido das partículas são mais desejáveis (Yang &amp; Wyman, 2008).</p>
Tamanho e custo dos reatores	<p>Os reatores onde são realizados determinados tipos de pré-tratamento devem apresentar tamanho físico e custo razoável, sendo constituído com materiais de construção com capacidade para suportar ambientes altamente corrosivos (Alvira et al., 2010; Yang &amp; Wyman, 2008).</p>
Custo de soluções	<p>A utilização de soluções (ácidas e alcalinas, por exemplo) no pré-tratamento e subsequente neutralização deve ser mínima e não dispendiosa (Yang &amp; Wyman, 2008).</p>
Eficiência c/ baixo teor de humidade	<p>O uso de matérias-primas com alto teor de matéria-seca reduz o consumo energético durante o pré-tratamento (Alvira et al., 2010).</p>
Obtenção de elevados teores de açúcar	<p>A concentração conjunta de açúcares após operações de pré-tratamento e hidrólise enzimática deve ser superior a 10% de modo a garantir uma concentração adequada de etanol e assim conseguir a viabilidade do processo (Yang &amp; Wyman 2008).</p>
Distribuição uniforme de açúcares	<p>A distribuição de recuperação de açúcares entre pré-tratamento e hidrólise enzimática deve ser compatível com a escolha de microrganismos capazes de fermentar não só glucose (uma hexose) mas também pentoses, como a xilose e arabinose (hemiceluloses) (Yang &amp; Wyman, 2008; Lynd et al., 2002).</p>

(Tabela 2.12 continuação)

Recuperação de lenhina	A lenhina e outros constituintes devem ser recuperados após a etapa de pré-tratamento e convertidos em co-produtos com valor económico significativo (Yang & Wyman, 2008).
Necessidades mínimas de energia	As quantidades de trabalho e calor necessárias ao pré-tratamento devem ser baixas, contribuindo assim para uma maior sustentabilidade do processo (Yang & Wyman, 2008).

Durante as últimas décadas têm sido testados vários tipos de pré-tratamento, incluindo físicos, químicos, biológicos e físico-químicos, com o objetivo de favorecer a eficiência da etapa de hidrólise e, conseqüentemente, de fermentação (Jin et al., 2016). Cada tipo de pré-tratamento exerce um efeito específico na estrutura de celulose, hemiceluloses e lenhina, pelo que diferentes métodos e condições devem ser escolhidos de acordo com a matéria-prima estudada (Alvira et al., 2010).

#### 2.4.5.1.1. Físicos

Usualmente são utilizadas várias combinações de pré-tratamentos físicos, inclusivamente com outros tipos de pré-tratamento (Haghighi Mood et al., 2013). Alguns exemplos de pré-tratamentos físicos são a fragmentação mecânica, extrusão e radiação:

- Fragmentação mecânica

Envolve processos como a moagem, trituração e lascagem. Estes tratam da alteração macroscópica da biomassa, ou seja, consistem na redução do seu tamanho e das suas partículas com o objetivo de aumentar a área superficial passível de ser hidrolisada (Zhu & Pan, 2010), conduzindo a uma redução do grau de polimerização e cristalização. Isto é alcançado através da combinação entre processos como lascagem (após a qual a matéria se apresenta uma dimensão entre 10 – 30 mm), moagem e trituração (0,2 e 2 mm) (Y. Sun & Cheng, 2002). Os requisitos energéticos aqui envolvidos são relativamente elevados, dependendo da dimensão final das partículas e das características da própria biomassa, pelo que, tendo em conta o contínuo aumento do custo de energia, é possível constatar que este tipo de pré-tratamento não é viável à escala industrial (Alvira et al., 2010).

- Extrusão

Neste tipo de pré-tratamento a biomassa é submetida a aquecimento (40 a 230 °C, dependendo da matéria-prima e das restantes condições no reator), agitação mecânica (entre 50 a 350 rpm) e cisalhamento, resultando em alterações físicas e químicas na biomassa à medida que esta avança no reator do tipo extrusor. Este método apresenta várias vantagens, nomeadamente ao nível da ausência de formação de produtos inibidores, curtos tempos de residência, possibilidade de um processo contínuo e da ausência geração de efluentes, o que o torna aplicável a uma larga escala (Haghighi Mood et al., 2013).

Não obstante, os diferentes parâmetros passíveis de aplicação no reator têm de ser previamente considerados para que seja possível atingir a máxima eficiência no processo. Existem atualmente vários estudos nos quais se adicionam soluções alcalinas ou ácidas, além de enzimas durante o processo de extrusão no sentido de aumentar a eficiência na produção de bioetanol (Alvira et al., 2010; J. Zheng & Rehmann, 2014). No entanto, estas adições acarretam questões como o aumento do custo de operação (custo das soluções, danos de corrosividade, entre outros) (J. Zheng & Rehmann, 2014).

- Irradiação

Esta categoria de pré-tratamentos físicos inclui irradiação com raios gama, ultravioleta (UV), feixes de eletrões, microondas ou com ultrassons, a qual ainda está em processo de estudo à escala laboratorial. Entre estes o processo mais aplicado é a irradiação por microondas, o qual consiste numa interação direta entre um objeto aquecido e a biomassa, após a qual é aplicado um campo eletromagnético (Z. Hu & Wen, 2008). As vantagens deste método incluem curtos tempos de operação, elevada uniformidade da biomassa pré-tratada e menores requisitos energéticos em comparação com o processo de aquecimento convencional (Haghighi Mood et al., 2013). No geral, esta categoria de tratamento por irradiação acarreta elevados investimentos financeiros devido aos elevados requisitos energéticos, tornando-se desadequada a uma aplicação industrial.

#### **2.4.5.1.2. Químicos**

Os pré-tratamentos químicos referem-se ao uso de soluções para remover ou modificar componentes-chave que interferem com a sacarificação, nomeadamente hemiceluloses e lenhina (Zhu & Pan, 2010).

Em comparação com outros métodos, os pré-tratamentos químicos são considerados muito promissores ao nível da degradação de biomassas mais estruturalmente complexas e recalcitrantes (Behera, Arora, Nandhagopal, & Kumar, 2014; Song, Liu, Yan, Yuan, & Liao, 2014). Estes métodos podem ser aplicados variando o tipo de processo químico, sendo que a sua eficiência é altamente dependente do tipo de matéria-prima e do tipo de metodologia aplicada. De facto, serão obtidos diferentes resultados ao tratar diferentes biomassas lenhocelulósicas com o mesmo pré-tratamento, como resultado da sua complexidade e variabilidade da estrutura de cada biomassa (Kang, Park, & Jeong, 2013; Sambusiti, Monlau, Ficara, Carrère, & Malpei, 2013; Y. Zheng, Zhao, Xu, & Li, 2014). Por outro lado, são observadas variações nos resultados obtidos em diferentes pré-tratamentos com a mesma matéria-prima, visto que cada tipo de pré-tratamento químico atua em diferentes partes do material e em diferentes graus (Pellera & Gidarakos, 2017).

- Pré-tratamentos alcalinos

Os pré-tratamentos alcalinos podem ser usados para remover lenhina e assim aumentar a digestibilidade da celulose (Jönsson & Martín, 2016). Em comparação com processos ácidos ou hidrotérmicos, este tipo de pré-tratamento conduz a uma menor degradação das hemiceluloses e da celulose e a uma menor formação de compostos inibidores (Carvalho F, Duarte LC, 2008). Além disso, apresentam também a vantagem de poderem ser operados a uma menor gama de temperatura, podendo até ser realizados à temperatura ambiente (com a desvantagem de assim requerer maiores tempos de operação, passando de minutos ou horas para dias ou semanas).

Soluções de hidróxido de sódio (NaOH) e de potássio (KOH) são as mais utilizadas, mas o seu custo é uma séria limitação, pelo que por vezes são também empregues hidróxido de cálcio (também conhecido como “cal hidratada”) ( $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ) e hidróxido de amoníaco ( $\text{NH}_4\text{OH}$ ). Estas soluções provocam a dilatação da biomassa, aumentando a sua área superficial e diminuindo o grau de polimerização e cristalinidade da celulose (Rabemanolontsoa & Saka, 2016).

À medida que a lenhina é removida, a reatividade dos restantes polissacarídeos aumenta. Grupos acetilo e vários ácidos urónicos presentes nas hemiceluloses que dificultam o acesso das enzimas à superfície da celulose são também removidos (Chandra et al., 2007; Nathan Mosier, Wyman, et al., 2005). Um aspeto importante nos pré-tratamentos alcalinos é que a própria biomassa consome parte da solução alcalina (G. A. Agbor, Vinson, & Donnelly, 2014; Hendriks & Zeeman, 2009). Isto é, a concentração residual da solução após o consumo de solução alcalina pela biomassa é a concentração que fica disponível para a reação (Gossett, Stuckey, Owen, & Mccarty, 1982).

A extração alcalina pode também provocar solubilização, redistribuição e condensação da lenhina. Estes efeitos podem contrariar ou neutralizar os efeitos positivos relativamente à remoção da lenhina e inchamento da celulose (Gregg, D. & Saddler, 1996). Outro aspeto relevante neste tipo de pré-tratamento é a mudança da estrutura celulósica para uma forma mais densa e mais estável que a celulose nativa (R. C. Pettersen, 1984).

Estudos demonstram que os pré-tratamentos alcalinos são mais eficazes em biomassas com baixo conteúdo em lenhina, tais como resíduos agrícolas, tornando-se menos rentáveis à medida que o conteúdo neste componente aumenta (V. B. Agbor, Cicek, Sparling, Berlin, & Levin, 2011; Alvira et al., 2010).

- Pré-tratamentos ácidos

Neste tipo de pré-tratamento químico são utilizados ácidos como catalisadores (Rabemanolontsoa & Saka, 2016). Visto que as ligações glucosídicas das hemiceluloses e celulose são susceptíveis a ácidos, o principal objetivo deste tipo de pré-tratamento é a



hidrólise/solubilização das hemiceluloses, para que a superfície da celulose fique mais acessível para a etapa de hidrólise (Alvira et al., 2010; Shaoni Sun et al., 2016). Durante este método, a lenhina solubilizada condensa e precipita em ambientes acídicos (C. Liu & Wyman, 2003; Shevchenko, S.M., Beatson, R.P., & Saddler, 1999).

Este tipo de pré-tratamento pode ser realizado com ácidos concentrados (a baixas temperaturas) ou diluídos (a elevadas temperaturas). Apesar da solubilização de hemiceluloses e remoção da lenhina terem maior expressão na aplicação de ácidos concentrados, a utilização de ácidos em elevadas concentrações é menos atraente para a produção de bioetanol, devido à elevada formação de compostos inibidores, nomeadamente furfural e HMF. Além disso, os problemas associados à corrosão dos equipamentos, aos elevados requisitos energéticos e económicos relativos à recuperação de ácido após o pré-tratamento, além das elevadas quantidades de soluções de neutralização [que origina quantidades significativas de sulfato de cálcio ( $\text{CaSO}_4$ ), também conhecido como “gesso”] desvalorizam a utilização de tais concentrações. Assim, é possível afirmar que à escala comercial, a utilização de pré-tratamentos com ácidos concentrados não é viável, visto os elevados custos de operação e manutenção (Haghighi Mood et al., 2013; Rabemanolontsoa & Saka, 2016; Hendriks & Zeeman 2009; Mosier et al., 2005).

O pré-tratamento com ácido diluído (DA) constitui uma opção mais favorável para aplicação industrial, tendo sido estudada uma larga variedade de biomassa lenhocelulósica. Pode ser realizado a alta temperatura (e.g. 180 °C) durante curtos períodos de tempo, ou a menores temperaturas (e.g. 120 °C) durante maiores tempos de retenção (entre 30 a 90 minutos) (Alvira et al., 2010).

Este tipo de método solubiliza/remove eficientemente hemiceluloses em açúcares monoméricos (em especial xilose, mas também arabinose, galactose, glucose e manose) assim como oligossacarídeos solúveis, melhorando assim a acessibilidade à celulose (P. Kumar, Barrett, Delwiche, & Stroeve, 2009). Atingir elevadas conversões de xilano em xilose é necessário para atingir favoráveis rendimentos globais, visto que aquele polissacarídeo representa cerca de um terço de todos os carboidratos em muitos materiais lenhocelulósicos, podendo o monómero ser convertido em etanol na fase fermentativa (Hinman et al., 1992). Assim, o pré-tratamento com ácido diluído é provavelmente o método mais aplicado dentro dos pré-tratamentos químicos, dada a sua eficácia em solubilização de hemiceluloses e baixo custo, e dos mais aplicados a materiais lenhocelulósicos (Y. Sun & Cheng, 2002).

Em comparação com os pré-tratamentos com ácido concentrado, apresenta a vantagem de consumir uma menor quantidade de ácido (concentrações entre 0,5 e 4 %) (Scheper T. & Olsson L., 1979). Porém, são necessárias temperaturas mais elevadas (entre 100 e 200 °C) que podem resultar na degradação das hemiceluloses (Rabemanolontsoa & Saka, 2016). No entanto, consoante a temperatura de operação há formação de alguns inibidores, como furfural, HMF e componentes aromáticos resultantes da degradação parcial da lenhina,

afetando o metabolismo dos microorganismos na etapa de fermentação (Saha, Iten, Cotta, & Wu, 2005). Estes próprios inibidores podem ser degradados, a elevadas temperaturas, originando produtos indesejados, como ácido fórmico ( $\text{CH}_2\text{O}_2$ ) e levulínico ( $\text{C}_5\text{H}_8\text{O}_3$ ) (Haghighi Mood et al., 2013).

No pré-tratamento de materiais lenhocelulósicos têm sido comumente utilizados ácidos minerais, tais como ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ), clorídrico ( $\text{HCl}$ ), fosfórico ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) ou nítrico ( $\text{HNO}_3$ ) (Alvira et al., 2010; Nathan Mosier, Wyman, et al., 2005). No entanto, estes ácidos minerais não são propícios à remoção da lenhina, visto que, mesmo após o pré-tratamento, os resíduos lenhocelulósicos apresentam ainda elevados teores de lenhina. Um processo adicional de deslignificação é necessário para melhorar a digestibilidade dos resíduos lenhocelulósicos (Shaoni Sun et al., 2016). Existe também a possibilidade de aplicação de ácidos orgânicos, tais como ácido fórmico ( $\text{CH}_2\text{O}_2$ ), acético ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ), propanóico ( $\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_2$ ), fumárico ( $\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_4$ ), maleico ( $\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_4$ ) e oxálico ( $\text{C}_2\text{H}_2\text{O}_4$ ). No entanto, devido aos seus índices de acidez relativamente baixos e alta solubilidade para a lenhina, são necessárias concentrações elevadas para a sua aplicação em materiais lenhocelulósicos (Shaoni Sun et al., 2016).

#### 2.4.5.1.3. Físico-químicos

- Pré-tratamentos hidrotérmicos

O processamento hidrotérmico é uma abordagem na qual água no estado líquido ou gasoso é usada para tratar biomassa lenhocelulósica, antes da etapa de hidrólise (F. Hu & Ragauskas, 2012). As duas tecnologias amplamente conhecidas e englobadas nesta categoria são o pré-tratamento com água líquida sobreaquecida e a explosão a vapor (sem adição de catalisadores).

- Água líquida sobreaquecida

Este método hidrotérmico (LHW – “liquid hot water”), também conhecido como autohidrólise (Gírio et al., 2010), é considerado um dos mais eficientes processos de pré-tratamento considerando aspetos técnicos e económicos (Kruse & Dinjus, 2007). Neste processo, a água é o único agente de reação, não havendo adição de nenhum outro aditivo químico. Deste modo não se levantam questões ao nível da necessidade de secura prévia da biomassa, potencial de corrosividade, recuperação de ácido ou formação de precipitados, reduzindo custos operacionais e de capital, além dos benefícios ambientais (V. B. Agbor et al., 2011).

Esta tecnologia realiza-se sob elevadas gamas de temperatura (150 a 240 °C) e de pressão (5 a 20 bar). Sob estas condições ocorre a autohidrólise, ou auto-ionização, da água em iões hidrónio ( $\text{H}_3\text{O}^+$ ), que agem como promotores para a clivagem entre as ligações das hemiceluloses, resultando na formação de ácido acético (Imman, Arnthong, Burapatana, & Champreda, 2014). Posteriormente, este ácido age como um autocatalizador que hidrolisa as

hemiceluloses e altera a estrutura da lenhina, provocando um aumento de acessibilidade à superfície da celulose. Este processo já demonstrou uma eficiência de remoção de cerca de 80% de hemiceluloses, além da capacidade de melhorar a digestibilidade de biomassas herbáceas, como palha de milho e trigo e bagaço de cana-de-açúcar (Alvira et al., 2010; Nathan Mosier, Hendrickson, Ho, Sedlak, & Ladisch, 2005).

Ao controlar o pH entre valores 4 e 7 minimiza-se a formação de compostos inibidores (Hendriks & Zeeman, 2009; Jönsson & Martín, 2016). Neste ambiente, um aspeto importante é que grande parte das hemiceluloses fica presente na fração líquida após o pré-tratamento, maioritariamente na forma de oligossarídeos e não de monossacarídeos, precisamente para reduzir a formação de produtos de degradação (da Silva, Torres Ortega, & Rong, 2016; Gírio et al., 2010; Imman et al., 2014; Nathan Mosier, Hendrickson, et al., 2005). Apesar da maioria da fração de celulose restar no resíduo sólido (a sua degradação ocorre apenas acima de 240 °C) (Shaoni Sun et al., 2016), também parte da lenhina insolúvel é aqui retida, agindo como uma barreira física à acessibilidade da celulose (W. Wang, Zhuang, Yuan, Yu, & Qi, 2015).

- Explosão a vapor

Realizado sem a adição de catalisadores, este tipo de pré-tratamento é outro método hidrotérmico, onde se utiliza água sobreaquecida no estado de vapor para hidrolisar a biomassa. Esta é sujeita a vapor pressurizado (entre 0,7 e 4,8 MPa) durante determinado período de tempo (segundos a minutos) sendo de repente despressurizado, separando as fibras da biomassa (V. B. Agbor et al., 2011). Em paralelo com este aspeto mecânico existem efeitos químicos observados na autohidrólise das hemiceluloses acima mencionados. Além da hidrólise parcial das hemiceluloses, a lenhina é redistribuída e parcialmente removida.

As principais vantagens deste método são o baixo impacto ambiental, baixo investimento de capital e elevado rendimento na hidrólise enzimática, o que o torna adequado para uma escala industrial. As principais desvantagens deste método são a destruição incompleta da lenhina e hemiceluloses, que aumenta o risco de condensação e precipitação da lenhina solúvel, diminuindo a digestibilidade da biomassa, além da possível geração, em elevadas temperaturas, de inibidores à fermentação (V. B. Agbor et al., 2011).

A explosão a vapor é o pré-tratamento físico-químico mais utilizado para biomassa lenhocelulósica, tendo sido realizado com sucesso em angiospérmicas, resíduos agrícolas e biomassa herbácea (Alvira et al., 2010). No entanto, não tem sido demonstrada a mesma eficiência para gimnospérmicas, devido ao seu baixo conteúdo em grupos acetilo na fração das hemiceluloses (V. B. Agbor et al., 2011; Alvira et al., 2010). Para este tipo de biomassa é necessária a utilização de catalisadores, como dióxido de enxofre (SO<sub>2</sub>) ou injeção de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), necessários para aumentar a digestibilidade da celulose e melhorar a hidrólise da celulose, além de baixar a temperatura ótima necessária à reação (Y. Sun & Cheng, 2002). As desvantagens acopladas ao uso de catalisadores são requisitos mais

específicos de equipamentos e a maior formação de compostos de degradação (Alvira et al., 2010; Nathan Mosier, Wyman, et al., 2005).

A principal diferença entre o pré-tratamento com água líquida sobreaquecida e a explosão a vapor é a quantidade e concentração de produtos solubilizados. No primeiro, esta quantidade é maior, ao contrário da concentração dos produtos que é mais elevada no segundo método. (Bobleter, 1994). Isto é provavelmente devido a um maior “input” de água no primeiro método, que atua como dissolvente (Hendriks & Zeeman, 2009).

As tabelas 2.13 e 2.14 resumizam as comparações, vantagens e desvantagens entre cada tecnologia de pré-tratamento mais relevantes.

Tabela 2.13 - Comparação entre os diferentes pré-tratamentos utilizados na parte laboratorial deste trabalho.

Características desejáveis	Alcalino	Ácido diluído	LHW
↑ Remoção da lenhina	+	0	- / 0
↑ Área superficial disponível	+	+	+
↑ Solubilização/remoção das hemiceluloses	+	++	++
↑ Produção de monossacarídeos a partir das hemiceluloses	- / 0	++	-
↓ Produção de oligossacarídeos a partir das hemiceluloses	- / 0	+	-
↑ Recuperação de celulose	+	++	++
↑ Digestibilidade da celulose	++	++	+
↓ Formação de inibidores	+	- / 0	+ / 0
↓ Problemas de corrosão	- / 0	-	0
↓ Necessidade de catalisadores	-	-	+
↓ Necessidade de neutralização	-	-	NR
↓ Custos de investimento	0 / +	+	+
↓ Custos operacionais	-	0	+
↓ Uso de energia	+	-	-

Fontes: Aditiya, Mahlia, Chong, Nur, & Sebayang, 2016; Alvira et al., 2010; Conde-Mejía, Jiménez-Gutiérrez, & El-Halwagi, 2012; Gírio et al., 2010; Jönsson & Martín, 2016; Menon & Rao, 2012; Nathan Mosier, Wyman, et al., 2005; Zabel et al., 2016.

**Legenda:** + vantagem; - desvantagem; 0 neutro; NR não relevante.

Tabela 2. 14 - Resumo dos outros tipos e tecnologias de pré-tratamentos.

<b>Pré-tratamento</b>	<b>Breve descrição</b>	<b>Vantagens</b>	<b>Desvantagens</b>
Ozonólise	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tratamento com ozono, normalmente a temperatura ambiente e pressão normal</li> <li>• Tempo de reação é de várias horas</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Degradação selectiva da lenhina com efeitos mínimos na celulose e hemiceluloses</li> <li>• Baixa formação de inibidores, sem formação de furfural ou HMF</li> <li>• Temperatura ambiente e pressão</li> <li>• Geração local de ozono e direta utilização</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Elevada reatividade, inflamabilidade, corrosividade e perigosidade</li> <li>• Elevada geração de custos, devido a energia necessária</li> <li>• Características exotérmicas do processo podem requerer sistemas de refrigeração</li> </ul>
Líquidos iónicos	<ul style="list-style-type: none"> <li>• São sais tipicamente compostos por grandes catiões orgânicos ou pequenos aniões inorgânicos</li> <li>• Existem no estado líquido à temperatura ambiente e assim se mantêm numa larga gama de temperaturas (&lt;100 °C)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sem formação de gases tóxicos ou explosivos</li> <li>• Carboidratos e lenhina podem ser simultaneamente dissolvidos</li> <li>• Degradação mínima dos produtos desejados</li> <li>• Baixa temperatura</li> <li>• Elevada solubilidade da lenhina</li> <li>• Melhora a hidrólise enzimática</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tecnologia dispendiosa</li> <li>• Necessidade de lavagem antes de reutilização</li> <li>• Falta de métodos comerciais para recuperação dos líquidos iónicos</li> <li>• Temperatura e carga de biomassa durante o pré-tratamento afeta a taxa de hidrólise</li> </ul>

(Tabela 2.14 continuação)

Pré-tratamento	Breve descrição	Vantagens	Desvantagens
Solventes orgânicos	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tratamento com mistura de solventes orgânicos ou aquosos, como metanol, etanol ou acetona</li> <li>• Solventes podem ser combinados com catalisadores ácidos como ácido sulfúrico, clorídrico, oxálico ou salicílico para quebrar as ligações das hemiceluloses</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Recuperação de lenhina relativamente pura, como subproduto</li> <li>• Perda mínima de celulose (menos de 2%)</li> <li>• Elevado rendimento do material pré-tratado</li> <li>• Baixa degradação dos açúcares</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Formação de inibidores</li> <li>• Elevados custos na remoção de solventes do sistema</li> </ul>
Explosão de fibras com amoníaco	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tratamento com amoníaco líquido anidro, a temperaturas entre 60 e 120 °C, acima de 3 MPa durante 30 a 60 minutos, seguida por repentina descompressão</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Aumenta a área superficial da biomassa</li> <li>• Redução na cristalinidade da celulose</li> <li>• Remoção das hemiceluloses</li> <li>• Remoção da lenhina</li> <li>• Alteração da estrutura da lenhina</li> <li>• Sem formação de inibidores</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Pouco eficiente em biomassa de gimnospérmicas</li> <li>• Preocupações ambientais</li> </ul>
Oxidação húmida	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Pré-tratamento oxidativo da biomassa, usando oxigénio ou ar como catalisador</li> <li>• Realizada durante 10 a 15 minutos, a 170 – 200 °C, a 10 – 12 bar</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Solubilização da hemicelulose e lenhina</li> <li>• Aumento da digestibilidade da celulose</li> <li>• Baixa formação de inibidores</li> <li>• Remoção de lenhina</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Elevados custos do oxigénio</li> <li>• Necessidade de elevadas gamas de temperatura e pressão</li> </ul>
Biológico	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tratamento com microrganismos (bactérias, fungos e actinomicetas)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Degradação da lenhina</li> <li>• Redução do grau de polimerização da celulose e hemiceluloses</li> <li>• Sem necessidade de soluções químicas</li> <li>• Sem necessidade de condições ambientais severas</li> <li>• Baixos custos de capital</li> <li>• Baixa necessidade energética</li> <li>• Baixa formação de inibidores</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Taxa muito lenta de degradação e de remoção da lenhina</li> <li>• Perda de carboidratos para consumo dos microrganismos</li> <li>• Longos tempos de residência (10 a 14 dias)</li> <li>• Remoção da lenhina é dependente da estirpe utilizada</li> </ul>

Fontes: Alvira et al., 2010; Nathan Mosier, Wyman, et al., 2005; Park, Kim, Koo, Yeo, & Choi, 2010; Paulová, Melzoch, Rychtera, & Patáková, 2013; Szczodrak & Fiedurek, 1996; Travaini, Martín-Juárez, Lorenzo-Hernando, & Bolado-Rodríguez, 2016; Zabed et al., 2016.

### 2.4.5.2. Hidrólise

Na produção de etanol lenhocelulósico, a hidrólise (ou sacarificação) é uma fase importante uma vez que é aqui que polissacarídeos são convertidos nos seus monómeros correspondentes, permitindo estimar a quantidade de glucose que é sujeita à fermentação alcoólica (Brodeur et al., 2011; F. & Shastri, 2016). Dependendo da matéria-prima lenhocelulósica e do pré-tratamento utilizado, os polissacarídeos referidos podem ser a celulose e/ou as hemiceluloses. Isto também significa que, os açúcares monoméricos formados nesta fase podem ser glucose, mas também pentoses originadas a partir da ruptura de ligações das hemiceluloses (figura 2.10) (Fatih Demirbas et al., 2011).

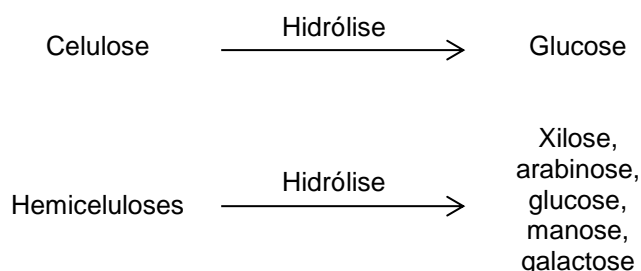
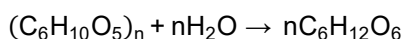


Figura 2.10 - Processo simplificado da hidrólise de celulose e hemiceluloses presentes na biomassa pré-tratada.

Assim, finalizados os pré-tratamentos, a celulose é preparada para a etapa de hidrólise, o que implica uma clivagem das moléculas através da ação de uma molécula de água (Balat et al., 2008):



Esta reação pode ser catalisada por ácido diluído, ácido concentrado ou por enzimas (celulases). De notar que existem ainda outras hipóteses de hidrólise, como a hidrólise alcalina, mas que devido ao seu baixo valor comercial não serão discutidos nesta dissertação.

#### 2.4.5.2.1. Ácida

A hidrólise ácida da biomassa pré-tratada pode ser feita com duas abordagens: em ácido diluído ou ácido concentrado. Na maior parte dos casos, é utilizado ácido sulfúrico, embora outros ácidos possam ser utilizados, como ácido nítrico (HNO<sub>3</sub>), clorídrico (HCl) ou fosfórico (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) (Zabed, Sahu, Suelly, Boyce, & Faruq, 2017).

A hidrólise tem como objetivo partir as ligações glicosídicas da celulose e das hemiceluloses. Em hidrólise completa, a celulose é dividida em monómeros de glucose, enquanto que das hemiceluloses resultam açúcares simples como a xilose, arabinose, glucose, manose ou galactose. No entanto, a extensão da reação hidrolítica depende da espécie da biomassa, do tipo e concentração do ácido utilizado, além das condições de pressão, temperatura e tempo

de reação. Assim, em caso de hidrólise incompleta, a fragmentação dos carboidratos acima referidos dá origem a oligossacarídeos ou outros polissacarídeos (com menor número de monômeros) (Karimi, Kheradmandinia, & Taherzadeh, 2006). Em suma, a etapa de hidrólise ácida assume um papel fundamental na determinação de açúcares totais, na medida em que separa açúcares simples ou cadeias de modo a possibilitar a determinação da sua concentração.

A hidrólise com ácido diluído é realizada em elevadas condições de temperatura e pressão, com curtos tempos de residência (entre segundos e minutos) (Balat et al., 2008). Este processo envolve concentrações de ácido até 1% num reator de fluxo contínuo a alta temperatura (cerca de 215 °C). A maioria dos processos de hidrólise diluída está sujeita a uma eficiência de recuperação de açúcares de 50% (Balat, 2011). A combinação de ácido a elevadas temperaturas e pressões obriga ao uso de reatores de matérias específicos, o que aumenta o preço dos mesmos (Zabed et al., 2017).

O segundo tipo de hidrólise é normalmente realizado a menores temperaturas, em ácido concentrado, seguido por uma diluição em água, para dissolver e hidrolisar a biomassa. As concentrações de ácido normalmente utilizadas neste processo são 10 – 30% (Balat, 2011). Os tempos de reação são superiores aos utilizados no processo com ácido diluído (Zabed et al., 2017). Deste modo, há uma conversão completa da celulose e hemiceluloses, superior à hidrólise com ácido diluído, com um pouco de produtos de degradação (Balat et al., 2008). Os fatores mais importantes para tornar este processo economicamente viável são a otimização da recuperação de açúcares, assim como a reciclagem do ácido (Balat, 2011).

#### **2.4.5.2.2. Enzimática**

O processo de degradação enzimática de biomassa lenhocelulósica envolve obrigatoriamente a aplicação de um ou um conjunto de pré-tratamentos, dada a complexa estrutura química da biomassa lenhocelulósica, que a impede de ser sujeita a uma digestão enzimática direta. Após esta etapa, o material pré-tratado e neutralizado está então apto para ser convertido enzimaticamente em açúcares fermentáveis (Gao et al., 2013).

As enzimas (“zyme”, que significa “levedura” na língua grega) são proteínas complexas que reduzem a energia de activação de uma reação (energia necessária para iniciar a reação), funcionando como catalisadores de processos biológicos (Hijazin et al. 2010).

A hidrólise enzimática da celulose realiza-se em condições não muito severas (pH entre 4,5 e 5,5 e temperaturas entre 45 e 50 °C) e é o resultado da ação sinérgica de celulasas. As celulasas são conjuntos de enzimas específicas com diferentes mecanismos de ação, que rompem determinadas ligações da celulose, libertando os monómeros de glucose (Fenila & Shastri 2016; Fatih Demirbas et al. 2011). Existem, pelo menos, três grandes grupos de celulasas, sendo que todas têm em comum a habilidade de hidrolisar as ligações glicosídicas



$\beta$ -1,4 entre as moléculas de D-glucose (Sofia & Rodrigues, 2014). A nomear (Abdul Fattah et al., 2016):

- Endoglucanases (nomenclatura IUPAC<sup>4</sup>: EC 3.2.1.4) que atacam regiões com baixa cristalinidade (amorfos), criando cadeiras livres;
- Exoglucanases (EC 3.2.1.91) que se movem ao longo da cadeia de celulose, produzindo, nas suas terminações, unidades de celobiose (dissacarídeo constituído por duas moléculas de glucose);
- $\beta$ -glucosidase (EC 3.2.1.21) que hidrolisam a celobiose para originar monómeros de glucose.

As celulasas podem ser produzidas por bactérias (como *Bacillus* spp.) ou fungos (sendo os mais comuns *Trichoderma* spp. e *Aspergillus* spp.). Estes microorganismos podem ser aeróbios, anaeróbios, mesófilos ou termófilos (Y. Sun & Cheng, 2002). Além disto, também existem enzimas hidrolíticas disponíveis como preparações comerciais como Celluclast, Cellic CTec2, Novozymes 188 e Accellerase (Kumar et al. 2012; Harrison et al. 2013; Fockink et al. 2015; Ko et al. 2016; El-Zawawy et al. 2011; Rodrigues et al. 2015; Srinorakutara et al. 2015).

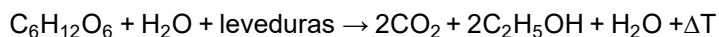
Além das celulasas, existe também uma grande variedade de hemicelulasas. No entanto, a maior parte da investigação tem sido dedicada à hidrólise do xilano, devido a ser o polímero com maior potencial de aplicação. Além disto, é também, dentro das hemiceluloses, o que se apresenta em maiores quantidades em determinados materiais lenhocelulósicos. No entanto, há que ter em conta que a hidrólise dos xilanos requer múltiplas enzimas, uma vez que são quimicamente mais complexos que a celulose, nomeadamente por apresentarem monómeros de xilose e arabinose (Balat, 2011).

#### 2.4.5.3. Fermentação

A fermentação é um processo metabólico que converte açúcares solúveis em etanol, na ausência de oxigénio (Mupondwa et al., 2017; Rastogi and Shrivastava, 2017). Neste processo, o hidrolisado é introduzido a um agente de fermentação específico (bactéria ou levedura) adequado aos açúcares maioritários presentes no hidrolisado (e.g. a bactéria *Z. mobilis* metaboliza preferencialmente glucose) (Aditiya et al., 2016). No entanto, não é expectável que o hidrolisado seja uniforme em termos da sua composição em monómeros de açúcar, apresentando frações de diferentes monómeros, alguns oligossacárideos, inibidores e substâncias não digeríveis. Os hidrolisados de matérias-primas ricas em amido contêm maioritariamente glucose ou um dissacarídeo (maltose), enquanto os hidrolisados de biomassa lenhocelulósica possuem pentoses e hexoses (Zabed et al., 2017). Numa reação típica de fermentação por uma levedura, a glucose é convertida em etanol de acordo com a reação seguinte:

---

<sup>4</sup> “International Union of Pure and Applied Chemistry” (União Internacional de Química Pura e Aplicada)



Teoricamente, cada 100 kg de glucose e xilose pode produzir 49 kg de dióxido de carbono e 51 kg de etanol (Zabed et al., 2017; Pasha et al., 2007). Durante a fermentação cerca de 95% de açúcares solúveis são convertidos em etanol e  $\text{CO}_2$ , 1% é convertido em matéria celular das leveduras e 4% é convertido noutros subprodutos solúveis, como o glicerol (Boulton, Singleton, Bisson, & Kunkee, 1999).

Em comparação com a fermentação de hidrolisado resultante de matérias-primas amiláceas (que contém apenas glucose), o hidrolisado da biomassa lenhocelulósica contém uma mistura de pentoses e hexoses. As hexoses (glucose, galactose e manose) são facilmente fermentáveis por vários organismos, nomeadamente leveduras da estirpe *Saccharomyces cerevisiae* ou *Zymomonas mobilis*. No entanto, microorganismos naturais não conseguem fermentar pentoses (xilose e arabinose). Nestes casos, organismos de estirpes como *Pachysolen tannophilus*, *Pichia stipitis*, *Kluyveromyces marxianus* ou *Candida shehatae* conseguem fermentar a xilose, apesar da taxa de oxigénio necessária a estes microorganismos possa atuar como fator limitante à conversão destes açúcares em bioetanol (Zabed et al., 2016).

Em suma, após submeter a biomassa lenhocelulósica a pré-tratamentos de forma a aumentar a disponibilidade da celulose para a sacarificação enzimática, diferentes celulasas e hemicelulasas atuam a nível da celulose e hemiceluloses de forma a converter estes polissacarídeos em hexoses e pentoses (glucose e xilose, por exemplo), respetivamente.

#### 2.4.5.4. Processos de conversão integrados

Os açúcares formados como resultado da sacarificação podem posteriormente ser convertidos em bioetanol por uma variedade de microrganismos através do processo de fermentação, sendo que a este processo faseado se pode chamar de hidrólise e fermentação separadas (SHF – “separate hydrolysis and fermentation”) (Wingren, Galbe, & Zacchi, 2003).

Por outro lado, a produção de bioetanol pode ainda ser otimizada integrando as reações de hidrólise enzimática e fermentação, isto é, realizando a sacarificação e a fermentação de forma simultânea (SSF – “simultaneous saccharification and fermentation”). Neste processo, ambos os passos ocorrem no mesmo reator. Assim que ocorre a libertação de açúcares da biomassa, estes são rapidamente convertidos em etanol, diminuindo assim a acumulação de açúcares inibidores no meio. Esta operação requer menos equipamento e a concentração de etanol no meio evita possíveis contaminações. No entanto, trata-se de um processo de difícil otimização, em termos de temperatura por exemplo, dado que devem ser consideradas as enzimas e as leveduras em simultâneo (Rastogi and Shrivastava, 2017; Mupondwa et al., 2017).

Outra metodologia integrada corresponde à sacarificação e co-fermentação simultâneas (SSCF – “simultaneous saccharification and co-fermentation”). Esta abordagem foca-se na assimilação

microbiana de todos os açúcares libertados durante o pré-tratamento e hidrólise da biomassa lenhocelulósica. Pode ser feito utilizando culturas mistas de leveduras com a capacidade de metabolizar hexoses e pentoses ou com apenas um microrganismo que assimila hexoses e pentoses, de forma a permitir um maior rendimento de bioetanol. Este sistema de integração apresenta um custo reduzido, tempo de operação curto, bem como um risco de contaminação baixo e menos fatores de inibição tanto na hidrólise enzimática como na fermentação (Rastogi & Shrivastava, 2017).

Outra alternativa é a conversão microbiana direta (CBP – “consolidated bioprocessing”). Na produção de etanol celulósico, este tipo de processo combina a produção de celulases, hidrólise do substrato e fermentação da glucose numa única etapa e reator. Em comparação com o método SHF, a conversão microbiana direta é mais vantajosa a nível de custos de produção, devido a um menor número de etapas e sem a necessidade de compra de enzimas. Além disso, apresenta uma maior eficiência de conversão e menores requisitos de energia (Aditiya et al., 2016).

## **2.5. Valorização material de resíduos lenhocelulósicos**

Para além da utilização como matérias-primas para produção de biocombustíveis sólidos, líquidos ou gasosos, os materiais lenhocelulósicos e os seus resíduos podem também ser valorizados no sentido de criação de produtos de valor acrescentado. Nesta perspetiva, podem ser aproveitados na produção de ecomateriais de construção (e.g. aglomerados ou biocompósitos concebidos a partir do engaço de uva), no fabrico matérias para o setor agroindustrial (e.g., eco-espumas à base de biomassa florestal), fonte de diversos compostos de relevância industrial (e.g. produção de produtos com características antioxidantes) e produção de adsorventes industriais de base carbonosa.

Um adsorvente é uma substância de natureza porosa, com elevada área superficial e com capacidade para adsorver substâncias na sua superfície através de forças intermoleculares. Os adsorventes podem apresentar carácter anfotérico, podendo a carga da superfície ser positiva ou negativa em função do pH do meio. Estas cargas são responsáveis pelas forças eletrostáticas de atração ou repulsão entre o soluto e o adsorvente (Mohammed et al. 2012).

A poluição de águas tem origem nas mais variadas fontes, entre as quais o setor industrial. Durante a actividade de uma indústria, e.g. têxtil, cosmética e alimentar, geram-se efluentes coloridos, que podem ser tóxicos e não biodegradáveis. Estes efluentes apresentam, portanto, corantes na sua constituição, que, se apresentarem origem sintética são especialmente difíceis de tratar dada a sua composição aromática. Se descartados em corpos de água sem devido tratamento, além de poluição visual, provocam impactes negativos na saúde pública (alguns corantes são cancerígenos e mutagénicos) e nos ecossistemas hídricos incidentes (principalmente ao nível de interferência nos ciclos biológicos, como a fotossíntese) (Correia, 2015).

Atualmente, o tratamento de águas contaminadas é realizado com base num conjunto de técnicas, nomeadamente a osmose inversa, trocas iônicas, eletrodialise, eletrólise, adsorção, entre outras (Ali et al. 2012). No entanto, enquanto o custo de tratamento dos quatro primeiros exemplos varia entre 10 a 450 \$.m<sup>-3</sup>, o tratamento por adsorção tem um custo entre 5 e 200 \$.m<sup>-3</sup> (Ali et al. 2012). Assim, a adsorção é dos métodos de tratamento de efluentes dada a sua facilidade de operação, capacidade de adsorver poluentes orgânicos solúveis e insolúveis e baixo custo em comparação com outras técnicas. Na adsorção, o carvão ativado é frequentemente empregue, visto apresentar uma estrutura porosa aumentada e, por consequência, maior área superficial. No entanto, a aplicação deste tipo carvões em atividades como remoção de moléculas orgânicas, como corantes, torna-se dispendiosa, dado o seu elevado custo de produção e de recuperação, pelo que há necessidade de utilizar, em alternativa, adsorventes de baixo custo. Estes, que podem consistir em materiais naturais ou sintéticos, para além de ser economicamente mais vantajosos, tornam-se especialmente apelativos no sentido de sustentabilidade ambiental, se forem compostos por resíduos ou subprodutos industriais ou agrícolas, entre os quais lenhocelulósicos (Gupta & Suhas, 2009; Crini, 2006).

## Capítulo 3 – Metodologia

O esquema da figura 3.1. resume as atividades laboratoriais realizadas no presente estudo. Primeiramente, para avaliação do potencial de produção de bioetanol a partir dos resíduos lenhocelulósicos contaminados, é feita uma caracterização dos resíduos, no intuito de avaliar a aplicabilidade dos mesmos em processos de valorização energética. De seguida, foi realizada uma etapa de pré-tratamentos, onde se testaram vários catalisadores e condições reacionais. Após cada ensaio, avaliaram-se as frações sólidas e líquidas, com o objetivo de selecionar o ensaio de pré-tratamento mais vantajoso para a produção de bioetanol. Finalmente, foi aplicada uma hidrólise ácida aos resíduos sólidos pré-tratados, calculando-se, de seguida, o rendimento teórico de produção através da concentração em açúcares redutores. Foram também realizados ensaios de adsorção e de dessorção, na perspetiva de valorização por utilização dos resíduos contaminados como adsorventes de baixo custo.

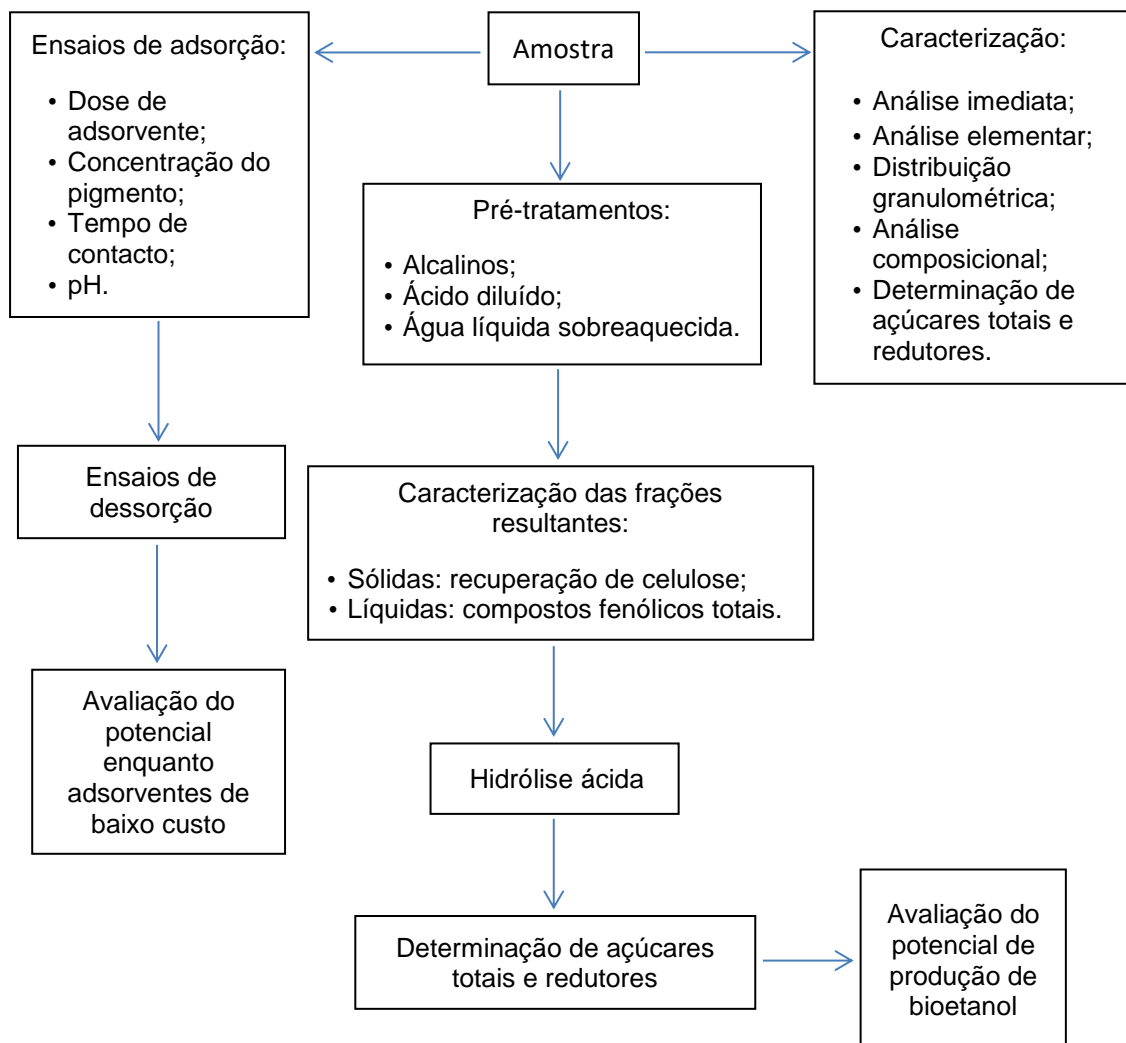


Figura 3.1 - Esquema sequencial das atividades laboratoriais realizadas no presente estudo.

### 3.1. Matérias-primas

As matérias-primas em análise são materiais lenhocelulósicos pulverizados. Dois deles, “CITRI A” (figura 3.2a) e “CITRI B” (figura 3.2b), provêm da empresa CITRI - Centro Integrado de Tratamento de Resíduos Industriais, S.A., localizada no distrito de Setúbal, em Portugal. Ambas são recolhidas pelos sistemas de aspiração durante o processo de moagem integrado na produção de combustíveis derivados de resíduos (CDR), sendo posteriormente depositados em aterro. Estas amostras apresentam uma grande variedade de resíduos na sua composição, incluindo materiais lenhocelulósicos (papel, cartão, resíduos de madeira, entre outros), materiais poliméricos (plásticos), têxteis, borracha, beatas de tabaco, entre outros. A diferença entre os dois resíduos A e B é a sua data de produção e de recolha para este estudo.

O terceiro resíduo lenhocelulósico pulverizado (“CMC”) (figura 3.3) foi fornecido pela empresa Casal e Carreira Biomassa S.A., localizada no distrito de Leiria, Portugal. Esta amostra consiste em pó de pinho e resulta da moagem de madeira de pinheiro durante a produção de mobiliário. Dada a sua homogeneidade, e devido facto de ser produzida a partir de pinheiro, o resíduo “CMC” foi utilizado neste estudo como termo de referência (comparação) aos resíduos heterogéneos.

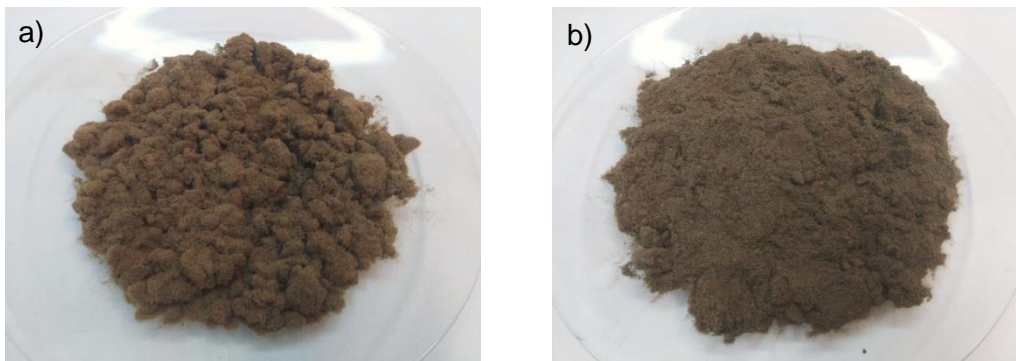


Figura 3.2 - Resíduos lenhocelulósicos heterogéneos – a) “CITRI A”, b) “CITRI B”.



Figura 3.3 - Resíduo lenhocelulósico homogéneo – “CMC”.

### 3.2. Caracterização das amostras

Antes de serem utilizadas em qualquer procedimento, todas as amostras foram crivadas a um diâmetro de 500 µm (com exceção da distribuição granulométrica).

Todos os ensaios aqui incluídos foram realizados em triplicado, à exceção da análise elementar, realizada em duplicado.

#### 3.2.1. Análise imediata

##### 3.2.1.1. Determinação do teor de humidade

O teor de humidade (H (%m/m)) foi determinado gravimetricamente de acordo com a norma BS EN 14774-2:2009. Foram colocadas caixas de Petri a secar ( $105 \pm 2$  °C) na estufa (Memmert 854 Schwabach). Após 1 hora, foram arrefecidas num exsiccador até atingirem a temperatura ambiente, sendo, de seguida, pesadas numa balança analítica (Mettler Toledo AB204-S) ( $m_1$ ). De seguida, colocou-se em cada caixa cerca de 1,0 g de amostra ( $m_2$ ). As caixas de Petri que continham amostra foram colocadas (destapadas) na estufa, a  $105 \pm 2$  °C, durante 12 h. Após este período, foram retiradas da estufa, arrefecidas até à temperatura ambiente em exsiccador e posteriormente pesadas ( $m_3$ ). Este processo de aquecimento foi repetido até massa constante. Esta análise permite identificar o teor de água e substâncias voláteis que a amostra perde durante a secagem, sendo calculada de acordo com a equação 3.1:

$$H (\% \text{ m/m}) = \left( \frac{m_2 - m_3}{m_2 - m_1} \right) \times 100 \quad \text{.....Eq. 3.1}$$

##### 3.2.1.2. Determinação do teor de cinzas

O teor de cinzas (C (%m/m)) foi obtido segundo uma adaptação da norma BS EN 14775:2009. Colocaram-se cadinhos numa mufla (Nabertherm) a  $550 \pm 10$  °C, durante 1 h. Após a calcinação, foram retirados e arrefecidos num exsiccador até temperatura ambiente e pesados em balança analítica ( $m_1$ ). De seguida, colocou-se cerca de 1,0 g de amostra em cada cadinho, anotando-se a massa do conjunto ( $m_2$ ). Os cadinhos foram novamente colocados na mufla a  $550 \pm 10$  °C, durante 2 horas. Em seguida, os cadinhos foram arrefecidos até temperatura ambiente em exsiccador e novamente pesados ( $m_3$ ). Repetiu-se a incineração das amostras em períodos de 1 h até se atingir massa constante. O teor de cinzas foi calculado de acordo com a equação 3.2:

$$C (\% \text{ m/m}) = \left( \frac{m_3 - m_1}{m_2 - m_1} \right) \times 100 \quad \text{.....Eq. 3.2}$$

### 3.2.1.3. Determinação do teor de matéria volátil

O teor de matéria volátil (MV (%m/m)) foi determinado segundo a norma BS EN 15148:2009. Foram colocados cadinhos e tampas na mufla a  $900 \pm 10$  °C, durante 7 minutos. Após calcinação, cadinhos e respetivas tampas foram arrefecidos até atingirem a temperatura ambiente e pesados, em conjunto, na balança analítica ( $m_1$ ). Posteriormente, colocou-se cerca de 1,0 g de amostra em cada cadinho, pesando-se o conjunto (massa cadinho + tampa + amostra) ( $m_2$ ). Repetiu-se a calcinação, à mesma temperatura, durante o mesmo intervalo de tempo, com cadinhos tapados. Finalmente, cada conjunto foi arrefecido até temperatura ambiente e pesado na balança analítica ( $m_3$ ). O teor de matéria volátil foi calculado de acordo com a equação 3.3:

$$MV (\% m/m) = \left( \frac{m_2 - m_3}{m_2 - m_1} \right) \times 100 \dots\dots\dots \text{Eq. 3.3}$$

### 3.2.1.4. Determinação do teor de carbono fixo

O teor de carbono fixo foi calculado por diferença, de acordo com a equação 3.4.

$$CF (\% m/m) = 100 - (C (\% m/m) + MV (\% m/m)) \dots\dots\dots \text{Eq. 3.4}$$

## 3.2.2. Análise Elementar

A análise elementar consiste na determinação da percentagem mássica de azoto (N), carbono (C), hidrogénio (H) e enxofre (S). A análise foi realizada num analisador elementar Thermo Finnigan - CE Instruments, modelo Flash EA 112 CHNS series. Este procedimento foi realizado no Laboratório de Análises REQUIMTE – Departamento de Química da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, Caparica, Portugal.

Para a realização desta análise foram recolhidos cerca de 3,0 mg de amostra homogeneizada. A percentagem mássica de oxigénio foi obtida através da diferença entre 100 % e a soma dos valores médios determinados para o teor de N, C, H e S (equação 3.5).

$$O (\%) = 100 - (N (\%) + C (\%) + H (\%) + S (\%)) \dots\dots\dots \text{Eq. 3.5}$$

À percentagem de oxigénio (O (%)) foi também subtraído o teor em cinzas, respeitante a cada resíduo.

### 3.2.3. Distribuição granulométrica

Para realizar a distribuição granulométrica  $F_x$  (% m/m) das amostras, sobrepuseram-se 4 crivos (Endecotts Ltd.) de modo a que o que apresentasse poros de maior diâmetro ficasse no



topo e o de menor na base: 500 > 425 > 250 > 125 µm. De seguida, pesou-se cerca de 20,0 g de amostra, tal como recebida, numa balança comum (AE Adam CB 501). Uma vez obtida essa quantidade, colocou-se a amostra no topo da coluna de crivos e fez-se a crivagem, por agitação manual, durante cerca de 20 minutos. Após esse período, retirou-se para um gobelé a fração de amostra retida em cada crivo e pesou-se. O cálculo da percentagem relativa a cada fração  $F_x$  é feito consoante a equação 3.6.

$$F_x (\% \text{ m/m}) = \frac{\text{Massa da fração crivada (g)}}{\sum \text{Massas das 5 frações crivadas (g)}} \times 100 \dots\dots\dots \text{Eq. 3.6}$$

### 3.2.4. Análise composicional

#### 3.2.4.1. Teor de extrativos

O conteúdo em extrativos ( $X_{\text{Extrativos}} (\% \text{ m/m})$ ) foi determinado segundo uma adaptação da norma Tappi 204 (Buchanan, 2007). Num cartucho de extração vazio ( $m_1$ ), colocou-se cerca de 5,0 g de amostra ( $m_2$ ). Este conjunto foi inserido num extrator de Soxhlet, ao qual foi acoplado um balão de fundo redondo, aquecido por convecção através de uma manta de aquecimento (Ibx Instruments). A extração foi realizada com acetona (LabChem), num intervalo de tempo suficiente para que o solvente voltasse a ser incolor. Após extração, o cartucho foi seco e pesado ( $m_3$ ). A equação 3.7 expressa a percentagem de extractivos em relação à massa de amostra seca ( $m_2$ ).

$$X_{\text{Extrativos}} (\% \text{ m/m}) = \left( 100 - \frac{m_3 - m_1}{m_2} \right) \times 100 \dots\dots\dots \text{Eq. 3.7}$$

#### 3.2.4.2. Teor de celulose

O teor em celulose ( $Y_{\text{Celulose}} (\% \text{ m/m})$ ) foi obtido com o método de Kürschner-Hoffer, no qual se incubou cerca de 1,0 g amostra ( $m_1$ ) numa mistura volúmica de 1:4 de ácido nítrico (Panreac, 65%) e etanol (Carlo Erba, 96%), respetivamente. Este procedimento foi realizado num banho termostaticado (Memmert 854 Schwabach) a 80 °C, sob frequente agitação, durante três fases consecutivas, cada uma com duração de 1h (Pettersen, 1984). Entre cada um dos três ciclos e consecutiva decantação, filtrou-se o sobrenadante numa bomba de vácuo (Vacuubrand MZ 2C NT). Ao fim de 3 horas de incubação, o precipitado celulósico foi, após filtração, lavado repetidamente com etanol, água ultrapura e água ultrapura a 50 °C até, aproximadamente, pH neutro (Auxenfans et al., 2014). Após secagem na estufa (105 ± 2 °C) durante 1 h, pesou-se o resíduo sólido recuperado ( $m_2$ ), repetindo-se o processo de secagem até massa constante. O conteúdo em celulose foi determinado consoante a equação 3.8.

$$Y_{\text{Celulose}} (\% \text{ m/m}) = \frac{m_2}{m_1} \times 100 \dots\dots\dots \text{Eq. 3.8}$$

### 3.2.4.3. Teor de lenhina insolúvel e solúvel

A percentagem em lenhina (solúvel e insolúvel) foi determinada de acordo com uma adaptação da norma Tappi 222 (Tappi, 2011).

Para obter o teor de lenhina insolúvel ( $M_{\text{Lenhina insolúvel}}$  (% m/m)) também conhecida como lenhina Klason (El-Zawawy et al., 2011), contido na amostra, colocou-se cerca de 1,0 g de amostra previamente extraída ( $m_1$ ) num gobelé (100 mL), ao qual se adicionou 25 mL de ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ , Fisher Scientific, 72%). O mesmo foi tapado com um vidro de relógio e colocado em banho a  $2 \pm 1$  °C. Após diluição da biomassa, manteve-se o gobelé tapado, num banho a  $20 \pm 1$  °C, durante 2h, agitando frequentemente. Ao fim deste período, transferiu-se a solução para um erlenmeyer que continha um volume de 400 mL de água destilada. Uma vez feita a diluição, transpôs-se a mistura para um frasco Schott (1000 mL) que foi, de seguida, colocado numa autoclave (Darlab K-400), durante 30 minutos, à temperatura de 121 °C. Após esta fase, transferiu-se a solução para um erlenmeyer, tapando-o com papel prata e deixou-se na “hotte” até à manhã seguinte. Finalmente, filtrou-se a vácuo a solução, reservando-se o líquido filtrado (lenhina solúvel) (Tappi, 2011). Após filtração, lavou-se a fração sólida (lenhina insolúvel) com água destilada aquecida, até pH neutro. Esta fração foi de seguida posta a secar a  $105 \pm 2$  °C durante 1 h. Após secagem, pesou-se o resíduo ( $m_2$ ). Realizaram-se secagens de 1 h até massa constante. O teor em lenhina insolúvel foi determinado de acordo com a equação 3.9.

$$M_{\text{Lenhina insolúvel}} (\% \text{ m/m}) = \frac{m_2}{m_1} \times 100 \dots\dots\dots \text{Eq. 3.9}$$

Para determinar o conteúdo em lenhina solúvel ( $N_{\text{Lenhina solúvel}}$  (% m/m)), procedeu-se a um método espectrofotométrico, baseado na absorção da radiação ultravioleta (UV). Assim, após devida diluição, o líquido filtrado anteriormente foi lido a 205 nm, num espectrofotómetro UV-Vis (Analytik Jena Spekol 1500 UV VIS) (Tappi, 2011). A concentração de lenhina solúvel presente em cada amostra foi calculada de acordo com a Lei de Lambert-Beer (equação 3.10) (Hatfield & Fukushima, 2005):

$$A = \varepsilon \times c \times d \dots\dots\dots \text{Eq. 3.10}$$

Onde:

A = absorvância;

$\varepsilon$  = absortividade ou coeficiente de extinção da lenhina ( $110 \text{ L.g}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) (Dence, 1992);

c = concentração ( $\text{g.L}^{-1}$ );

d = largura da célula de quartzo (1 cm).

Sabendo a concentração de lenhina solúvel, calculou-se a massa ( $m_3$ ) presente no volume de líquido filtrado da lenhina Klason, aplicando-se de seguida a equação 3.11, para determinar a percentagem de lenhina solúvel presente na amostra:

$$N_{\text{Lenhina solúvel}} (\% \text{ m/m}) = \frac{m_3}{m_1} \times 100 \dots\dots\dots \text{Eq. 3.11}$$

Finalmente, para determinar o conteúdo de lenhina total ( $Z_{\text{Lenhina total}} (\% \text{ m/m})$ ) (equação 3.12) presente na biomassa lenhocelulósica, somou-se o resultado obtido no cálculo da lenhina Klason e da lenhina insolúvel.

$$Z_{\text{Lenhina total}} (\% \text{ m/m}) = M_{\text{Lenhina insolúvel}} (\% \text{ m/m}) + N_{\text{Lenhina solúvel}} (\% \text{ m/m}) \dots \text{Eq. 3.12}$$

#### 3.2.4.4. Teor de hemiceluloses

A percentagem mássica em hemiceluloses ( $W_{\text{Hemiceluloses}} (\%)$ ) foi obtida por diferença entre 100 e a soma das percentagens mássicas anteriormente obtidas para os restantes componentes da biomassa lenhocelulósica (celulose, lenhina total e extrativos) (equação 3.13).

$$W_{\text{Hemiceluloses}} (\%) = 100 - (X_{\text{Extrativos}} (\%) + Y_{\text{Celulose}} (\%) + Z_{\text{Lenhina}} (\%)) \dots\dots\dots \text{Eq. 3.13}$$

#### 3.2.5. Açúcares totais

A determinação do teor de açúcares totais consistiu em dois processos sequenciais – hidrólise ácida quantitativa realizada com ácido diluído (Hoebler & Barry, 1989) e determinação colorimétrica, através do método do reagente fenol-sulfúrico (Dubois, Gilles, Hamilton, Rebers, & Smith, 1956).

Para realização da hidrólise ácida, começou-se por adicionar, num tubo de ensaio largo, 0,5 g de biomassa, 1,7 mL de água ultrapura e 3,3 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (Fisher Scientific, > 97%). Colocou-se depois o tubo num banho termostaticado a 30 °C, durante 1 h. Após este tempo, transferiu-se a mistura para um frasco Schott, adicionando-se 139 mL de água destilada, de forma a diluir a solução para uma concentração de 4% (m/m). De seguida, procedeu-se à autoclavagem, durante 1h, à temperatura de 121 °C. Uma vez terminado o processo, filtrou-se a amostra (hidrolisado) com um filtro resistente a solventes (Labor, 0,2  $\mu\text{m}$ ).

Para a realização da determinação colorimétrica, preparou-se uma solução de fenol (Panreac) a 5% m/v. Posteriormente, adicionou-se, em tubos de ensaio previamente limpos com solução ácida, 0,5 mL de hidrolisado filtrado e devidamente diluído, 0,5 mL da solução de fenol e 2,5 mL de ácido sulfúrico (> 95%). De seguida, procedeu-se à homogeneização da mistura em agitador de vórtice (Heidolph Reax top) e deixou-se repousar durante 10 minutos. Ao fim desse

período, colocaram-se os tubos num banho de água fria durante 15 minutos. Finalmente, as soluções foram lidas num espectrofotómetro (Pharmacia LKB-Novaspec II), a um comprimento de onda de 490 nm, contra um ensaio em branco, onde a amostra foi substituída por água destilada. Deste modo, para se obter a concentração de açúcares totais na biomassa foi necessária a elaboração de uma reta de calibração (figura 3.4), usando padrões de D-glucose (LabChem), com concentrações entre 10 e 100 mg.L<sup>-1</sup>, preparados por diluição a partir de uma solução-mãe com concentração de 1 g.L<sup>-1</sup>.

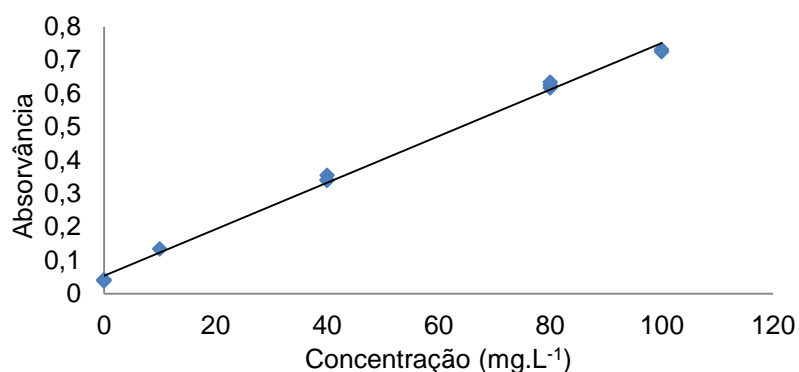


Figura 3.4 - Exemplo de reta de calibração utilizada para a determinação de açúcares totais (n=3).

### 3.2.6. Açúcares redutores

O teor de açúcares redutores presente nas amostras foi determinado de acordo com o método proposto por Miller (Miller, 1959). Este método baseia-se na reação de oxidação-redução entre reagente de ácido 3,5-dinitrossalicílico (DNS) (figura 3.5) e os açúcares redutores presentes na amostra. Nesta reação, o ácido DNS é reduzido a ácido 3-amino-5-dinitrosalicílico (composto de cor alaranjada, que absorve fortemente a luz a 540 nm), enquanto o grupo aldeído dos monossacarídeos é oxidado a grupos carboxilo (Miller, 1959; Vasconcelos, Pinto, & Aragão, 2013).

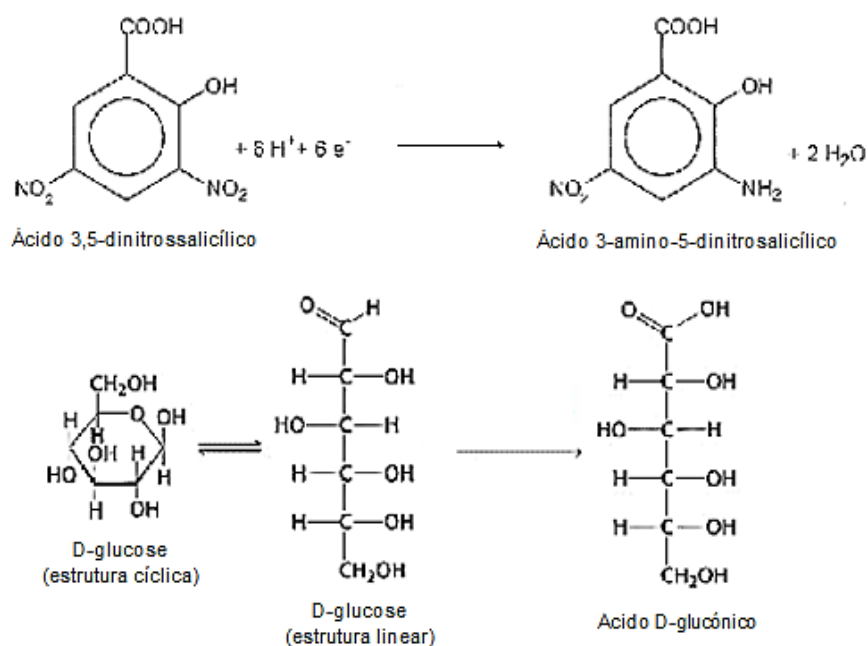


Figura 3.5 - Reações de redução e oxidação do reagente de ácido 3,5-dinitrossalicílico e da glucose, respetivamente.

Primeiramente, preparou-se o reagente DNS através da dissolução num litro de água destilada de 10 g de ácido 3,5-dinitrossalicílico (Sigma), 16 g de hidróxido de sódio (Akso Nobel Eka) e 300 g de tartarato duplo de sódio e potássio (Scharlau). De seguida, num tubo de ensaio, a uma amostra de 0,5 mL, devidamente diluída, adicionou-se igual volume de reagente de DNS. A mistura reacional foi homogeneizada em agitador de vortex e colocada num banho termostaticado a 100 °C, durante 5 minutos. Após incubação, deixou-se repousar durante 10 minutos até atingir a temperatura ambiente, para de seguida, serem adicionados 5 mL de água destilada. Por fim, a amostra foi lida num espectrofotómetro a 540 nm (Pharmacia LKB-Novaspec II), contra um ensaio em branco (água destilada). A concentração de açúcares redutores foi determinada através de uma reta de calibração previamente preparada, com padrões de D-glucose (LabChem) entre 50 e 1500 mg.L<sup>-1</sup>, preparados por diluição a partir de uma solução-mãe com concentração de 1 g.L<sup>-1</sup> (figura 3.6).

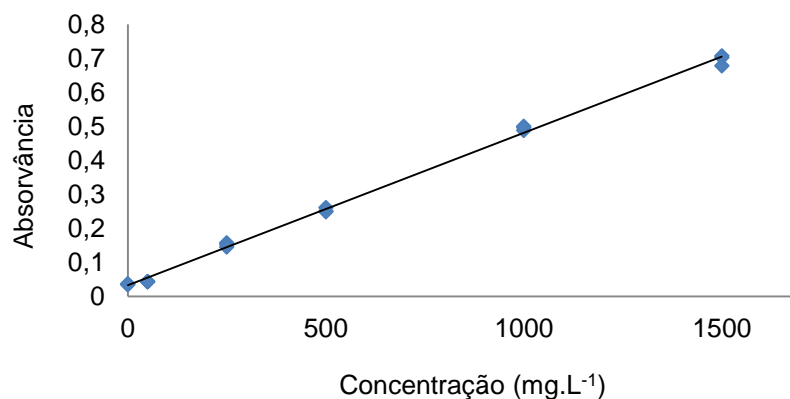


Figura 3.6 - Reta de calibração utilizada para a determinação de açúcares redutores (n=3).

### 3.2.7. Compostos fenólicos totais

O teor de compostos fenólicos totais foi determinado através do método de Folin-Ciocalteu (FC) (Folin & Boston, 1912), que se baseia na reação entre o reagente de FC e os compostos fenólicos presentes na amostra, formando uma mistura de óxidos de tungstênio ( $W_8O_{23}$ ) e de molibdênio ( $Mo_8O_{23}$ ). Os compostos fenólicos são determinados com base na redução de molibdênio (VI) para (V), que apresenta uma coloração azul e pode ser lida espectrofotometricamente num comprimento de onda entre 750 e 765 nm (Method OIV-MA-AS2-10, 2009). Esta reação ocorre em meio alcalino, pelo que se adiciona carbonato de sódio ( $Na_2CO_3$ ).

Para a determinação do teor de compostos fenólicos totais utilizou-se uma adaptação da metodologia descrita por Singleton e colaboradores (1999). Colocou-se, em tubos de ensaio, 0,5 mL de amostra devidamente diluída, 2,0 mL de água destilada, 0,5 mL de reagente de FC (Panreac) e 2,0 mL de  $Na_2CO_3$  (10 % m/v). A mistura foi agitada em vórtice e colocada a incubar no escuro (devido à fotossensibilidade do reagente de FC e dos compostos fenólicos), durante 1 h. Após incubação, a solução foi lida num espectrofotômetro (Pharmacia LKB-Novaspec II), contra um ensaio em branco (água destilada) a um comprimento de onda de 760 nm (Singleton, Orthofer & Raventós, 1999). A concentração de compostos fenólicos foi obtida após a construção da reta de calibração (figura 3.7), a qual foi obtida através de padrões de ácido gálico ( $C_7H_6O_5$ , Sigma), com concentrações entre 10 e 100  $mg.L^{-1}$ , preparados por diluição a partir de uma solução-mãe com concentração de 1  $g.L^{-1}$ .

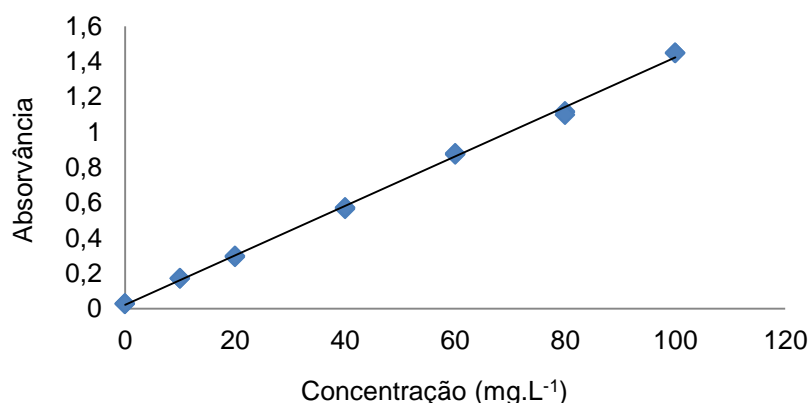


Figura 3.7 - Reta de calibração utilizada para a determinação de compostos fenólicos totais (n=3).

### 3.3. Pré-tratamentos

Os vários ensaios de pré-tratamentos foram realizados com o resíduo CITRI A e CMC. Deste modo, pretendeu-se testar cada tipologia de resíduo – um heterogéneo e um homogéneo, considerando assim a aplicabilidade deste estudo à escala industrial (pré-tratamento escolhido terá condições de reação previamente definidas, independentemente da composição dos resíduos heterogéneos, que varia diária/semanalmente).

Antes de serem utilizadas em qualquer procedimento, todas as amostras foram crivadas a um diâmetro de 500 µm, de acordo com as especificações da ASTM (Society, 1959).

Após cada um dos três diferentes tipos de pré-tratamento estudados (alcalinos, ácidos e hidrotérmico) foi aplicado o método de Kürschner-Hoffer (secção 3.2.4.2.) aos resíduos sólidos pré-tratados no intuito de determinar o conteúdo de celulose presente na amostra pré-tratada. Com este resultado, é assim possível seleccionar o pré-tratamento com maior índice de recuperação de celulose, para seguidamente ser aplicada a etapa de hidrólise. As frações líquidas resultantes de cada pré-tratamento foram reservadas no frio para posterior determinação de compostos fenólicos totais (secção 3.2.7.).

#### 3.3.1. Pré-tratamentos alcalinos

Nos pré-tratamentos alcalinos foram testados três tipos de soluções:

- Hidróxido de potássio aquoso 2 M (KOH);
- Hidróxido de potássio metanólico 2 M (KOH-MeOH);
- Mistura de água destilada com cinzas de biomassa (1 g.150 mL<sup>-1</sup>).

Para cada uma destas variáveis, pesou-se cerca de 5,0 g de amostra que se colocou dentro de um balão de fundo redondo juntamente com 150 mL de reagente (KOH, KOH-MeOH ou

H<sub>2</sub>O). O balão, ao qual se acoplou um condensador, era aquecido por convecção através de uma manta de aquecimento (figura 3.8).



Figura 3.8 - Sistema de refluxo utilizado para a realização dos pré-tratamentos alcalinos.

Cada amostra permaneceu em refluxo durante 1h. Após este período, filtrou-se a fração líquida para um frasco de vidro, reservando-se no frio e adicionou-se à amostra sólida dentro do balão, o mesmo volume para cada reagente. Este procedimento repetiu-se num total de três vezes sucessivas, para a mesma massa de amostra contida no balão.

### 3.3.2. Pré-tratamentos ácidos

Este tipo de pré-tratamento foi realizado com ácido diluído e englobou várias condições de hidrólise, entre as quais a variação de concentração do ácido utilizado, tempo de residência e temperatura de reação. Os ensaios foram realizados em triplicado num digestor, com tubos de digestão acoplados a condensadores (figura 3.9). Em cada ensaio, independentemente do fator de reação variado, pesou-se cerca de 2,0 g de amostra, previamente seca a  $105 \pm 2^\circ\text{C}$  durante 2 h, que se colocou dentro de cada tubo, juntamente com 40 mL de ácido sulfúrico (G. L. Guo, Chen, Chen, Men, & Hwang, 2008).



Figura 3.9 - Sistema de dissolução utilizado nos pré-tratamentos ácidos.



As concentrações de ácido testadas foram 0,5, 1, 2 ou 4% m/m, com um tempo de residência de 30 minutos, a uma temperatura de 160 °C. Após este período, os tubos de digestão foram retirados do digestor e postos imediatamente em água fria para que a reação hidrolítica terminasse (Yat, Berger, & Shonnard, 2008). Após este pré-tratamento filtrou-se a vácuo cada um dos conjuntos, reservando o filtrado para análises posteriores. O resíduo sólido foi lavado com água destilada para avaliação do conteúdo de celulose (secção 3.2.4.2.). Assim, o resultado obtido no método de Kürschner-Hoffer determinava as condições do ensaio seguinte. A tabela 3.1 resume as condições de reação utilizadas nos diversos ensaios de pré-tratamento ácido realizados.

Tabela 3.1 - Condições de reação em cada ensaio de pré-tratamento ácido realizado.

<b>Variação da concentração de ácido</b>	<b>[H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>] (% m/m)</b>			
Tempo de residência = 30 minutos Temperatura de operação = 160 °C	0,5	1	2	4
<b>Variação do tempo de residência</b>	<b>Δt (minutos)</b>			
[H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ] = 1 % m/m Temperatura de operação = 160 °C	10	30	60	
<b>Variação da temperatura de reação</b>	<b>T (°C)</b>			
[H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ] = 1 % m/m Tempo de residência = 30 minutos	120		160	

### 3.3.3. Água líquida sobreaquecida

Neste método hidrotérmico, colocou-se 25 g de amostra e 500 mL de água destilada num frasco de Schott (1000 mL), que foi colocado, em triplicado, na autoclave (figura 3.10) a uma temperatura de 121 °C, durante um período de 4 h. Terminado este período, colocou-se imediatamente o frasco em água fria, para que a hidrólise terminasse (Gao et al., 2013). A mistura foi posteriormente filtrada a vácuo, sendo que a fração líquida foi reservada no frio e a sólida lavada até pH neutro. Após estabilizado o pH, o resíduo sólido pré-tratado foi analisado para determinação do seu conteúdo em celulose.



Figura 3.10 - Autoclave utilizada no pré-tratamento de água líquida sobreaquecida.

### 3.4. Hidrólise ácida

Após definição do pré-tratamento com melhores resultados a nível de recuperação de celulose, aplicou-se uma hidrólise ácida no resíduo sólido pré-tratado. A metodologia aplicada na etapa de hidrólise ácida corresponde ao método detalhado anteriormente na determinação de açúcares totais. Assim, realizou-se, numa primeira fase, a hidrólise com ácido sulfúrico diluído (Hoebler & Barry, 1989) seguindo-se a determinação colorimétrica de açúcares totais e de açúcares redutores descritas nas secções 3.2.5. e 3.2.6., respetivamente.

### 3.5. Avaliação do potencial de produção de bioetanol

Após aplicação da hidrólise ácida, e tendo em conta os resultados de açúcares redutores obtidos para cada resíduo, foi calculado o potencial de produção de bioetanol para cada um dos resíduos. Os resultados apresentados foram obtidos consoante as equações 3.14, 3.15 e 3.16. É de notar que estes cálculos foram aplicados tanto antes e após a aplicação do pré-tratamento escolhido, de modo a comprovar o benefício da realização do mesmo.

$$m_{\text{glucose presente no hidrolisado}} \text{ (mg)} = \frac{\text{Açúcares redutores} \times \text{Volume de hidrolisado}}{1000 \text{ mL}} \quad \text{E.q. 3.14}$$

$$m_{\text{bioetanol possível de obter}} \text{ (mg)} = \frac{m_{\text{glucose}} \times 510}{1000} \quad \text{Eq. 3.15}$$

$$\text{Rendimento} \left( \% \frac{\text{m}}{\text{m}} \right) = \frac{m_{\text{bioetanol}}}{m_{\text{biomassa hidrolisada}}} \times 100 \quad \text{Eq. 3.16}$$

### 3.6. Tratamento estatístico dos resultados

Os dados obtidos nas análises relativas à componente de valorização energética deste trabalho foram submetidos a uma análise descritiva para avaliação de médias e desvios-padrão, recorrendo ao “software” SPSS (IBM® SPSS® Statistics 24). Realizou-se, em cada processo, uma análise da variância (“Analysis of Variance”, ANOVA) de forma a verificar se existiam diferenças estatisticamente significativas entre os valores médios. Para efetuar comparações múltiplas entre médias, foi utilizado o Teste de Tukey, para um nível de significância de  $p \leq 0,05$ .

### 3.7. Ensaio de adsorção – Valorização material

Para a avaliação da aplicabilidade dos resíduos de biomassa pulverizados com contaminação polimérica enquanto adsorventes de baixo custo, foi utilizado o resíduo CITRI A (figura 3.11). A escolha deste resíduo foi motivada pelos resultados obtidos na análise à distribuição granulométrica, isto é, optou-se pela amostra com menor área superficial. Deste modo, se os ensaios de absorção revelassem potencial com este resíduo, revelariam, em teoria, resultados ainda mais otimistas para a amostra com uma maior área de superfície.



Figura 3.11 - Resíduo lenhocelulósico com contaminação polimérica utilizado nos ensaios de adsorção e dessorção.

Antes de qualquer ensaio experimental, a amostra foi sujeita a um processo de crivagem (500  $\mu\text{m}$ ).

### 3.7.1. Ensaios de adsorção

Para obtenção de dados nos ensaios de adsorção foi previamente preparada uma reta de calibração (figura 3.12) usando concentrações de azul-de-metileno (MB) entre 0 e 10  $\text{mg.L}^{-1}$ .

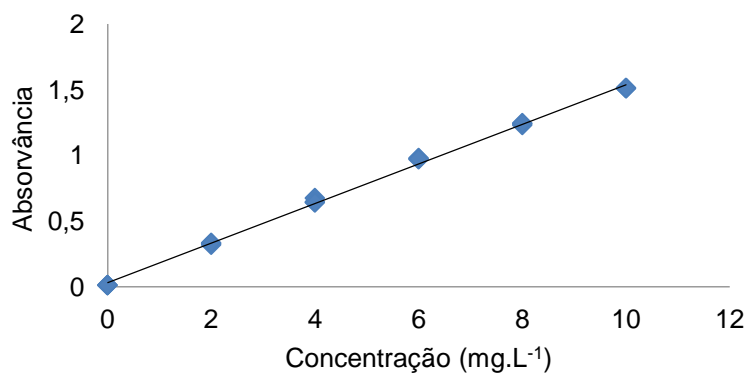


Figura 3.12 - Exemplo de reta de calibração de azul-de-metileno.

Os ensaios de adsorção foram realizados em tubos de centrífuga, à temperatura ambiente e numa velocidade de agitação de 10 rpm, no agitador “overhead” (Heidolph). As variáveis analisadas durante os ensaios de adsorção encontram-se descritas na tabela 3.2.

Tabela 3.2 - Ensaios de adsorção realizados.

Tabela 6.2 – Efeitos de adsorção realizados:											
Variação da dose de adsorvente	Dose (g.L <sup>-1</sup> )										
[MB] = 100 mg.L <sup>-1</sup> Tempo de contacto = 24 horas	5	10	20	40	80						
Variação da concentração de azul-de-metileno	[MB] (mg.L <sup>-1</sup> )										
Dose de adsorvente = 10 g.L <sup>-1</sup> Tempo de contacto = 24 horas	10	50	100	200							
Variação do tempo de contacto	Δt (min.)										
Dose de adsorvente = 10 g.L <sup>-1</sup> [MB] = 100 mg.L <sup>-1</sup>	2	7	15	30	60	120	240	360	480	900	1440
Variação do pH do soluto	pH										
Dose de adsorvente = 10 g.L <sup>-1</sup> [MB] = 100 mg.L <sup>-1</sup> Tempo de contacto = 1 h	2		6			12					

Primeiramente, variou-se a dose de adsorvente, seguida da concentração de azul-de-metileno, do tempo de contacto e, por fim, do pH do soluto. Em cada variação seleccionou-se a opção mais viável, usando esse resultado no teste de variação seguinte. Todos os testes foram realizados em triplicado e à temperatura ambiente. O pH do soluto não sofreu alterações até aos ensaios de variação do pH, mantendo um valor próximo de 6,5.

Após cada teste de variação, as amostras foram centrifugadas (Hettich Zentrifugen EBA 20) a 5000 rpm, durante 5 minutos. A concentração do azul-de-metileno no sobrenadante foi obtida através de leitura no espectrofotómetro (Pharmacia LKB-Novaspec II), num comprimento de onda de 665 nm.

A eficiência de remoção (R (%)) de azul-de-metileno e a capacidade de adsorção no equilíbrio ( $q_e$  (mg.g<sup>-1</sup>)), foram calculadas através das equações 3.17 e 3.18, respetivamente.

$$R (\%) = \frac{C_0 - C_e}{C_e} \times 100 \dots\dots\dots \text{Eq. 3.17}$$

$$q_e (\text{mg.g}^{-1}) = \frac{C_0 - C_e}{m} \times v \dots\dots\dots \text{Eq. 3.18}$$

Onde  $C_0$  e  $C_e$  correspondem, respetivamente, à concentração inicial e de equilíbrio de azul-de-metileno (mg.g<sup>-1</sup>) e m e v representam a massa (g) e o volume (L) de adsorvente e de soluto, respetivamente.

### **3.7.2. Ensaio de dessorção**

Para o estudo de dessorção, o resíduo foi colocado em contacto com uma solução de MB ( $100 \text{ mg.L}^{-1}$ ) numa dose de  $10 \text{ g.L}^{-1}$ , num tempo de contacto de 24 horas, em agitação em “overhead” a 10 rpm. Após este período, foi retirada a amostra e colocada a secar durante 24 horas. Posteriormente, a biomassa seca e carregada com pigmento, foi colocada em contacto com água a pH 2, numa dose de  $10 \text{ g.L}^{-1}$ , num tubo de centrifuga em banho termostatzado a  $80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , durante 15 minutos. Ao fim desse período foi aplicada agitação em vortex durante 60 segundos, seguido de centrifugação. Este procedimento foi repetido por três vezes consecutivas para a amostra carregada com pigmento. As soluções contendo pigmento libertado pela biomassa foram lidas em espectrofotómetro (Pharmacia LKB-Novaspec II) a 665 nm. Os ensaios foram realizados em triplicado.

---

## Capítulo 4 - Apresentação e discussão de resultados

### 4.1. Caracterização das amostras

#### 4.1.1. Análise imediata

As amostras utilizadas neste trabalho foram caracterizadas quanto à sua humidade, cinzas, matéria volátil e carbono fixo (análise imediata). A tabela 4.1 apresenta os valores médios e respetivos desvios-padrão obtidos para cada uma das amostras caracterizadas.

Tabela 4.1 - Valores médios e respetivos desvios-padrão obtidos na análise imediata.

Amostra	Humidade (% m/m “as received”)	Cinzas (% m/m bs)	Matéria volátil (% m/m bs)	Carbono fixo (% m/m bs)
CITRI A	$8,0 \pm 0,1^b$	$11,0 \pm 1,0^b$	$71,8 \pm 1,3^b$	$17,1 \pm 0,7^b$
CITRI B	$6,3 \pm 0,2^a$	$33,0 \pm 1,0^c$	$56,9 \pm 0,5^a$	$10,2 \pm 1,5^a$
CMC	$8,3 \pm 0,6^b$	$2,4 \pm 0,0^a$	$74,1 \pm 0,6^c$	$23,6 \pm 0,6^c$

*Nota: Valores classificados com letras diferentes na mesma coluna apresentam diferenças estatisticamente significativas ( $p \leq 0,05$ ).*

- Teor de humidade

Os três resíduos apresentaram baixa humidade, o que era expectável pois trata-se de amostras pulverizadas obtidas a partir dos sistemas de aspiração de unidades de produção de CDR e de produção de “pellets”. Durante o processo de secagem dos materiais processados, do seu corte e na operação de aspiração destes pós é também muito favorecida a evaporação da água presente na biomassa, pelo que todas as amostras apresentaram teor de humidade inferior a 10%.

Comparando os resultados obtidos no parâmetro da humidade, é possível verificar que a amostra CMC ( $8,3 \pm 0,6\%$  m/m) e CITRI A ( $8,0 \pm 0,1\%$  m/m) apresentam o valor mais elevado, contrariamente ao resíduo heterogéneo CITRI B ( $6,3 \pm 0,2\%$  m/m), que exibe o menor teor em água. Biomassas com elevado teor em água podem apresentar degradação e formação de bolores durante o tempo de armazenamento. Além disto, elevados teores de humidade atrasam a ignição da biomassa e diminuem o poder calorífico do sistema, devido ao consumo energético necessário à evaporação. Estes fatores provocam assim uma redução no rendimento de processos que envolvem conversões térmicas (Gong et al., 2016).

De acordo com Gallardo e co-autores (2014), o conteúdo de humidade de uma amostra varia significativamente consoante a matriz que o integra, nomeadamente ao nível da quantidade de plásticos, papel, madeira, têxteis, entre outros (Gallardo, Carlos, Bovea, Colomer, & Albarrán, 2014). Esta heterogeneidade verifica-se nas amostras CITRI A e CITRI B que contêm algumas frações de material não celulósico. Os teores de humidade para estes dois resíduos situam-se na gama tipicamente encontrada em CDR (4,0 a 25% m/m) (Cozzanij, Nicolella, Petarcaj,

Rovatti, & Togno, 2006; Rotheut & Quicker, 2017; Won, Done, Hoon, & Goo, 2010). O teor de humidade obtido para o resíduo composto por madeira de pinho pulverizada (CMC) está de acordo com o apresentado na literatura (entre, aproximadamente, 4,5% m/m e 10,1% m/m) (Vázquez-guerrero, Alfaro-cuevas-villanueva, & Cortés-martínez, 2016; Zhai et al., 2016; Zhang, Zhang, Zhu, Cheng, & Zhang, 2016).

- Teor em cinzas

Quanto ao conteúdo em cinza, observa-se uma grande disparidade entre as três amostras. O resíduo CMC ( $2,4 \pm 0,0\%$  m/m) apresenta um resultado abaixo de 5%, que é no entanto superior ao estipulado na literatura para pó de pinho, variando entre 0,37% e 0,71% m/m (Chaula, Said, & John, 2014; Zhang et al., 2016). Este resultado pode ser explicado pelo facto deste resíduo, embora de pinho, não apresentar uma composição totalmente pura, visto ser produzido a partir de resíduos de biomassa e não apenas dos troncos lenhosos de pinheiro, podendo incluir frações de casca e folhas, o que causa necessariamente um aumento da componente mineral.

Os resíduos heterogéneos CITRI A e CITRI B apresentam valores superiores a 10% ( $11,0 \pm 1,0\%$  m/m e  $33,0 \pm 1,0\%$  m/m, respetivamente), chegando o último a ultrapassar 30% de teor em cinzas. De facto, se considerarmos o conteúdo em cinzas típico de CDR, entre 10 e 25% m/m, apenas a amostra CITRI A se encontra de acordo com a literatura (Rotheut & Quicker, 2017; Won et al., 2010; Yaman & Haykiri-acma, 2016; Materazzi et al., 2015; Cozzanij et al., 2006). O facto de o resíduo CITRI B estar acima deste intervalo significa que apresenta uma composição inorgânica muito elevada, superior à típica destes combustíveis derivados de resíduos. Este facto não é surpreendente, pois a composição dos CDR varia diariamente, de acordo com a natureza dos resíduos rececionados e processados.

Assim, considerando apenas a análise imediata, é possível afirmar que, entre os três resíduos estudados, o único adequado para processos de conversão térmica, é a amostra de pinho (CMC). Os restantes resíduos apresentam, para além de uma fração orgânica, elevado conteúdo inorgânico, derivada da fração polimérica e têxtil, pelo que apesar de serem valorizados em co-incineração, é frequentemente necessário diluí-los com outros materiais para diluir esta característica menos favorável.

Biomassas com elevado conteúdo em cinzas ricas em metais alcalinos, como sódio (Na) ou potássio (K), tendem a provocar a formação de cloretos alcalinos que se acumulam em depósitos inorgânicos em zonas de transferência de calor – fenómeno de “fouling”. Além disto, existe também a possibilidade de aglomeração de cinzas dentro do reator (escórias) – fenómenos de “slagging” – que depende do comportamento de fusão da cinza e da sua composição química, nomeadamente do teor em sílica ( $\text{SiO}_2$ ) e em metais alcalinos (Na e K) (Chaula et al., 2014; Montané, Abelló, Farriol, & Berrueco, 2013; Stam, Livingston, Cremers, & Brem, 2010). Corrosão e incrustações nos tubos de sistema de combustão são outros



problemas que conduzem à diminuição de rendimento do processo. Um elevado teor em cinza pode também conduzir ao aumento de emissões de partículas à saída do sistema, o que, por sua vez, acarreta efeitos negativos ao nível do sistema respiratório, agravados quando estas partículas contêm metais pesados (Wannapeera, Fungtammasan, & Worasuwanarak, 2011).

- Teor em matéria volátil e carbono fixo

Os conteúdos em matéria volátil (MV) e carbono fixo (CF) estão relacionados com a facilidade de ignição da biomassa durante a combustão ou gaseificação e com o seu poder calorífico. Especificamente, o valor de MV refere os componentes que são libertados quando o combustível é aquecido na fase inicial do processo de combustão, incluindo compostos orgânicos voláteis, gases hidrocarbonetos, monóxido de carbono (CO) e hidrogénio (H<sub>2</sub>). O conteúdo em CF indica a massa remanescente após libertação de voláteis, ou seja o carbono não volátil mas oxidável, excluindo conteúdo em cinzas e humidade (García, Pizarro, Lavín, & Bueno, 2012).

Nestes parâmetros da análise imediata, os teores presentes em cada um dos três resíduos voltam a ser estatisticamente diferentes. A amostra CMC apresenta o conteúdo mais elevado em MV e CF ( $74,1 \pm 0,6\%$  m/m e  $23,6 \pm 0,6\%$  m/m, respetivamente), enquanto os valores significativamente inferiores correspondem ao resíduo contaminado CITRI B ( $56,9 \pm 0,5\%$  m/m e  $10,2 \pm 1,5\%$  m/m, respetivamente), classificando-o como o menos adequado a uma conversão térmica. Este resultado já era esperado, dado que os resíduos heterogéneos apresentam uma fração polimérica que influencia negativamente o teor de matéria volátil (Montané et al., 2013). O elevado teor de cinza destes resíduos também contribui para uma redução do teor de carbono fixo.

Os teores de MV obtidos nas três amostras estão aproximadamente de acordo com os intervalos encontrados na literatura para pó de pinho (entre 75,7 e 81,0% m/m) (Zhai et al. 2016; Chaula et al., 2014) e para CDR (60,16 a 84,0% m/m) (Rotheut & Quicker, 2017; Won et al., 2010). O mesmo acontece com os resultados do teor de CF nos resíduos CMC e CITRI A (entre 12,37 e 18,60% m/m para pó de pinho e entre 5,8 e 18,9% m/m para CDR) (Chaula et al., 2014; Cozzanij et al., 2006; Materazzi et al., 2015; Won et al., 2010; Zhai et al., 2016; Zhang et al., 2016).

#### **4.1.2. Análise elementar**

A análise elementar indica a percentagem de elementos químicos, nomeadamente azoto, carbono, hidrogénio, enxofre e oxigénio, em determinada biomassa. Apresentam-se, na tabela 4.2, os valores médios e respetivos desvios-padrão obtidos para cada amostra.

Tabela 4.2 - Valores médios e respetivos desvios-padrão obtidos na análise elementar. (\*Base livre de cinzas).

Amostra	Azoto (% m/m)	Carbono (% m/m)	Hidrogénio (% m/m)	Enxofre (% m/m)	Oxigénio* (% m/m)
CITRI A	1,1 ± 0,0 <sup>a</sup>	44,8 ± 0,3 <sup>b</sup>	5,8 ± 0,1 <sup>a</sup>	0,1 ± 0,0 <sup>b</sup>	37,2 ± 0,1 <sup>b</sup>
CITRI B	1,8 ± 0,0 <sup>b</sup>	34,4 ± 0,2 <sup>a</sup>	4,3 ± 0,1 <sup>b</sup>	0,9 ± 0,0 <sup>c</sup>	25,6 ± 0,1 <sup>a</sup>
CMC	3,7 ± 0,0 <sup>c</sup>	46,9 ± 0,2 <sup>c</sup>	5,8 ± 0,0 <sup>a</sup>	0,0 ± 0,0 <sup>a</sup>	41,3 ± 0,2 <sup>c</sup>

*Nota: Valores classificados com letras diferentes na mesma coluna apresentam diferenças estatisticamente significativas ( $p \leq 0,05$ ).*

- Teor em azoto

Relativamente ao teor de azoto, o valor médio significativamente mais elevado pertence à amostra CMC (3,7 ± 0,0% m/m) enquanto o teor médio significativamente mais baixo foi o da amostra CITRI A (1,1 ± 0,0% m/m). Segundo Rotheut e Quicker (2017), os resultados obtidos para ambos resíduos heterogéneos estão dentro dos valores estabelecidos para CDR, sendo estes 0,03 e 4,1% m/m (Rotheut & Quicker, 2017). No entanto, o teor obtido neste parâmetro para o resíduo CMC está acima dos valores médios de azoto para pó de pinho encontrados na literatura (0,14 a 2,39% m/m) (Zhai et al., 2016; Zhang et al., 2016; Chaula et al., 2014). Este desvio é provavelmente devido à presença dos resíduos de biomassa correspondentes a frações não lenhosas (folhas e casca) geralmente mais ricas em azoto.

A combustão de matérias-primas com elevados teores de azoto tem sérios impactes negativos ao nível da qualidade ambiental, além de efeitos nefastos provocados ao sistema respiratório. A emissão de NO<sub>x</sub> tem um importante papel na formação de chuvas ácidas, desencadeando danos na vegetação e corroendo materiais e infra-estruturas. Além disto, emissões de NO contribuem para a formação de partículas na atmosfera prejudiciais à saúde pública, além da criação de “smog” (Gallardo et al., 2014; World Bank Group, 1998).

- Teor em carbono

Relativamente ao conteúdo em carbono, o valor significativamente superior volta a pertencer à amostra CMC (46,9 ± 0,2% m/m), enquanto o resultado mais baixo coube ao resíduo CITRI B (34,4 ± 0,2% m/m). Zhai e co-autores (2016) obtiveram um teor de carbono de 46,49% m/m para pó de pinho, valor portanto semelhante ao obtido neste trabalho para o mesmo tipo de biomassa (Zhai et al., 2016). O resultado obtido para a amostra CITRI A (44,8 ± 0,3% m/m) situa-se no intervalo determinado por Rotheut e Quicker (2017), 40 a 75% m/m, para a percentagem mássica de carbono em CDR (Rotheut & Quicker, 2017). No entanto, o conteúdo deste elemento no resíduo CITRI B está abaixo dos resultados indicados na literatura, o que se poderá dever a uma elevada composição em materiais com baixo índice de carbono, sendo exemplos cartão e papel (nomeadamente o de revista) com percentagem mássica de carbono a rondar os 35%, pois são materiais com uma componente mineral mais elevada (Cozzanij et al., 2006; Grammelis, Basinas, Malliopoulou, & Sakellariopoulos, 2009).

- Teor em hidrogénio

De entre os resultados obtidos para a percentagem mássica de hidrogénio, destaca-se o facto de serem os resíduos heterogéneos, CITRI A ( $5,8 \pm 0,1\%$  m/m) e CITRI B ( $4,3 \pm 0,1\%$  m/m), a exibirem o valor significativamente mais elevado e mais baixo, respetivamente. Segundo Rotheut e Quicker (2017), ambos os valores obtidos estão aproximadamente de acordo com o teor de hidrogénio encontrado dos CDR (4,9 e 9,8% m/m) (Rotheut & Quicker, 2017). De referir que, de acordo com Chaula e co-autores (2014), o valor obtido para a amostra CMC ( $5,8 \pm 0,0\%$  m/m) corresponde aos revistos para o teor de H em pó de pinho (5,79% m/m) (Chaula et al., 2014).

- Teor em enxofre

Relativamente ao enxofre, as únicas amostras a apresentarem este elemento na sua matriz foram os resíduos CITRI A ( $0,1 \pm 0,0\%$  m/m) e CITRI B ( $0,9 \pm 0,0\%$  m/m). De acordo com o intervalo de valores obtido para o teor de enxofre em CDR, 0,0 e 0,7% m/m, (Haykırı-açma & Yaman, 2016; Won et al., 2010), os teores encontrados nos resíduos CITRI não são de estranhar e podem dever-se à elevada presença de materiais, como plásticos (“plastic film”), têxteis e/ou beatas de cigarro, cujos teores em enxofre se situam acima de 0,5% m/m (Materazzi et al., 2015). A queima de resíduos com elevado conteúdo em enxofre desencadeia problemas devido à formação de  $SO_x$ , também responsáveis pela formação de chuvas ácidas (Kulp, 1990).

- Teor em oxigénio

Quanto ao teor de oxigénio, a amostra com valor médio significativo mais elevado foi o resíduo CMC ( $41,3 \pm 0,2\%$  m/m), enquanto os resíduos CITRI A e CITRI B apresentaram teores de oxigénio mais baixos ( $37,2 \pm 0,1\%$  m/m e  $25,6 \pm 0,1\%$  m/m), decorrentes da presença de compostos poliméricos e minerais que reduzem a concentração relativa da componente lenhocelulósica.

O resultado obtido para o resíduo CMC é ligeiramente inferior ao teor de oxigénio obtido por Chaula e colaboradores para pó de pinho (43,20 % m/m) (Chaula et al., 2014). Os conteúdos em oxigénio dos resíduos CITRI A ( $37,2 \pm 0,1\%$  m/m) e CITRI B ( $25,6 \pm 0,1\%$  m/m), situam-se no intervalo estabelecido na literatura (16 a 45 % m/m,bs) para este tipo de resíduos (Materazzi et al., 2015; Won et al., 2010).

### 4.1.3. Distribuição granulométrica

A acessibilidade à área superficial da biomassa é um fator crucial que afeta a hidrólise de materiais lenhocelulósicos. Por sua vez, a área específica é influenciada pelo volume dos poros (ou porosidade) e pelo tamanho das partículas que constituem a biomassa. A digestibilidade destes materiais pode ser melhorada significativamente quando os seus poros apresentam volume suficiente para acomodar moléculas de ácido ou pequenos componentes enzimáticos (S Sun, Sun, Cao, & Sun, 2016).

A análise do tamanho de partículas foi realizada para os dois resíduos heterogêneos, CITRI A e CITRI B, no intuito de avaliar a heterogeneidade na distribuição granulométrica destes resíduos com a mesma origem e composição semelhante. A tabela 4.3 apresenta, para cada uma destas amostras, os valores médios obtidos e respectivos desvios-padrão relativos a cada crivo utilizado.

Tabela 4.3 - Valores médios e desvios-padrão obtidos na análise à distribuição granulométrica.

Amostra	F1 >500 $\mu\text{m}$ (% m/m)	F2 425< $\mu\text{m}$ <500 (% m/m)	F3 250< $\mu\text{m}$ <425 (% m/m)	F4 125< $\mu\text{m}$ <250 (% m/m)	F5 <125 $\mu\text{m}$ (% m/m)
CITRI A	23,2 $\pm$ 5,7 <sup>a</sup>	16,2 $\pm$ 4,3 <sup>a</sup>	14,4 $\pm$ 3,5 <sup>a</sup>	18,9 $\pm$ 2,3 <sup>a</sup>	27,4 $\pm$ 8,0 <sup>a</sup>
CITRI B	9,1 $\pm$ 2,5 <sup>a</sup>	2,3 $\pm$ 1,3 <sup>a</sup>	8,3 $\pm$ 0,7 <sup>a</sup>	23,6 $\pm$ 4,5 <sup>b</sup>	56,6 $\pm$ 4,2 <sup>c</sup>

*Nota: Valores classificados com letras diferentes na mesma linha apresentam diferenças estatisticamente significativas ( $p \leq 0,05$ ).*

A análise à distribuição granulométrica revelou que o resíduo CITRI A apresenta uma composição mais uniforme (desvio padrão de 5,3%) e sem diferenças estatisticamente significativas entre as percentagens relativas a cada fração, comparativamente ao resíduo CITRI B (desvio padrão de 21,9%). No entanto, é de notar que, em ambos os resíduos, a fração que apresenta maior expressão é a correspondente às partículas com tamanho inferior a 125  $\mu\text{m}$ , com 27,4  $\pm$  8,0% m/m e 56,6  $\pm$  4,2% m/m, respetivamente.

Os pré-tratamentos físicos têm impactes positivos no rendimento da produção de bioetanol, visto que aumentam a área de superfície específica disponível, reduzem o grau de polimerização e a cristalinidade da celulose, facilitando o acesso à matriz durante produção de bioetanol (Y. Sun & Cheng, 2002) .

No entanto, os pré-tratamentos mecânicos acarretam elevados gastos energéticos, que podem não ser economicamente viáveis quando transpostos à escala industrial (V. B. Agbor et al., 2011; Zhu & Pan, 2010). A dimensão dos materiais lenhocelulósicos após a aplicação de pré-tratamentos mecânicos é entre 10 a 30 mm em lascas e entre 0,2 a 2 mm após o processo de moagem ou trituração (Balat, 2011). No entanto, no sentido de aumentar a área superficial disponível à hidrólise, é preferível a utilização de materiais cujas partículas permitam assim a máxima acessibilidade das enzimas/ácido à biomassa. Um estudo efectuado por Dasari e

Berson confirmou esta suposição, ao realizar a hidrólise enzimática de resíduos de madeira de carvalho, com diferentes gamas de tamanhos de partículas. O estudo concluiu que, ao fim de 72 horas, os ensaios com as gamas de menor tamanho ( $33 < \mu\text{m} < 75$  e  $150 < \mu\text{m} < 180$ ) atingiram concentrações de glucose 50 a 55% maiores do que as gamas com resíduos de maior tamanho ( $295 < \mu\text{m} < 425$  e  $590 < \mu\text{m} < 850$ ) (Dasari & Berson, 2007). Além da concentração de glucose, foi também avaliado o efeito do tamanho das partículas na viscosidade da mistura reacional, tendo-se concluído que para a mesma quantidade de sólidos, a utilização de partículas nas gamas de  $150 < \mu\text{m} < 180$  e  $33 < \mu\text{m} < 75$ , resulta numa diminuição significativa da viscosidade quando comparada com a viscosidade registada em ensaios com partículas de maior diâmetro. Estes resultados indicam que um reduzido tamanho inicial das partículas de biomassa pode significar uma redução do tempo de residência durante a hidrólise enzimática. Além disto, dada a baixa viscosidade observada com partículas de menor tamanho, há assim hipótese de aumentar a carga mássica dentro do reator, atingindo maiores taxas hidrolíticas, reduzindo custos operacionais. Também a utilização de reatores de menor volume se torna possível, sendo este um fator importante e vantajoso em aplicações à escala industrial (Dasari & Berson, 2007).

Numa hidrólise ácida da biomassa lenhocelulósica, além de fatores como o tempo e temperatura de reação, concentração do ácido e razão sólido/líquido, a taxa de difusão do ácido sobre as partículas da matéria-prima é também um fator importante que afeta a hidrólise. Esta questão foi corroborada por Qi e colaboradores, ao investigarem o efeito da microestrutura (tamanho de partículas, porosidade e tortuosidade) das partículas de madeira de pinho pulverizada na eficiência de hidrólise com ácido sulfúrico diluído (Qi et al., 2015). O estudo concluiu que o comprimento da partícula pode efetivamente afetar a distribuição da concentração de ácido na sua superfície. Partículas de maior comprimento apresentam maior entrave à difusão do ácido, pelo que a concentração deste na superfície das partículas é mais baixa, e por consequência a taxa de hidrólise também é menor comparativamente a partículas de menor comprimento. O mesmo estudo determinou também que a porosidade da biomassa varia com a extensão da reação de decomposição e com a rutura da estrutura (em resultado da conversão da celulose e hemiceluloses), sendo que a ligação entre os poros facilita a difusão do ácido sob a superfície da biomassa (Qi et al., 2015).

Assim, tomando por base os resultados obtidos nestes referidos estudos, concluiu-se que o resíduo CITRI B será, teoricamente, o mais adequado para a produção de bioetanol, visto que apresenta maior proporção de partículas com menores tamanhos (aproximadamente, duas vezes mais). Como consequência da sua suposta maior área superficial, será obtido um maior rendimento durante a etapa de hidrólise, o que se traduz numa maior e mais economicamente viável produção de bioetanol.

No entanto, é preciso expor que existem estudos onde o tamanho das partículas apresentou efeito nulo ou negativo na produção de bioetanol. Chang e colaboradores (1997) determinaram

que a redução do tamanho de partículas de biomassa até menos de 400  $\mu\text{m}$  não tem efeito significativo no rendimento da hidrólise de biomassa (V. B. Agbor et al., 2011; A. K. Kumar & Sharma, 2017). A este ponto de vista se junta Jonglertjunya e colaboradores, que observaram a concentração de glucose durante a hidrólise com ácido diluído de cana-de-açúcar, a diferentes granulometrias inferiores a 500  $\mu\text{m}$ , sem obter diferenças significativas (Jonglertjunya, Makkhanon, Siwanta, & Prayoonyong, 2014). Sarkar e colaboradores alegam que, apesar da redução do tamanho da biomassa apresentar resultar positivos, uma redução mais extensa pode provocar impactos negativos nos processos seguintes ao pré-tratamento mecânico, como pré-tratamentos complementares e/ou hidrólise enzimática, devido à formação de aglomerados nestas etapas (Sarkar et al., 2012).

#### 4.1.4. Análise composicional

A análise composicional realizada a uma biomassa lenhocelulósica constitui uma fonte de informação importante sobre o potencial de produção de bioetanol (Haghighi Mood et al., 2013).

Para a conversão de um material lenhocelulósico em bioetanol, é necessário que os seus polissacarídeos (celulose e hemiceluloses) sejam hidrolisados nos seus correspondentes monómeros que, por sua vez, sofrerão a ação de leveduras no processo de fermentação (F. Hu & Ragauskas, 2012). Assim, consoante o número de monossacarídeos na solução após as operações de pré-tratamentos e de hidrólise, é possível calcular o rendimento teórico de produção de bioetanol.

Além disto, um elevado conteúdo em lenhina, em detrimento do conteúdo em holocelulose (soma de celulose e hemiceluloses), fornece uma indicação sobre o tipo de pré-tratamento mais indicado e a sua severidade, visto que este componente atua como uma barreira física que cobre os polissacarídeos.

No intuito de avaliar as relações entre holocelulose e os restantes componentes dos resíduos, foi realizada a sua análise composicional. Os valores médios e respetivos desvios-padrão obtidos referentes ao conteúdo em celulose, lenhina, hemiceluloses e extrativos são apresentados na tabela 4.4.

Tabela 4.4 - Valores médios e respetivos desvios-padrão obtidos na análise composicional (\*Base livre de extrativos).

Amostra	Holocelulose			Lenhina insolúvel* (% m/m)	Lenhina total* (% m/m)	Extrativos (% m/m)
	Celulose* (% m/m)	Hemiceluloses* (% m/m)	Total* (% m/m)			
CITRI A	35,5 $\pm$ 4,9 <sup>a</sup>	27,7 $\pm$ 7,4 <sup>b</sup>	63,2 $\pm$ 3,3 <sup>ab</sup>	27,1 $\pm$ 3,9 <sup>a</sup>	29,5 $\pm$ 4,0 <sup>a</sup>	7,2 $\pm$ 1,1 <sup>b</sup>
CITRI B	50,2 $\pm$ 2,3 <sup>b</sup>	8,4 $\pm$ 3,9 <sup>a</sup>	58,6 $\pm$ 2,1 <sup>a</sup>	33,8 $\pm$ 0,9 <sup>b</sup>	37,6 $\pm$ 0,8 <sup>b</sup>	3,8 $\pm$ 1,5 <sup>a</sup>
CMC	43,1 $\pm$ 0,2 <sup>ab</sup>	23,02 $\pm$ 1,8 <sup>b</sup>	66,2 $\pm$ 1,9 <sup>b</sup>	27,1 $\pm$ 1,8 <sup>a</sup>	29,3 $\pm$ 1,8 <sup>a</sup>	4,6 $\pm$ 0,1 <sup>ab</sup>

*Nota: Valores classificados com letras diferentes na mesma coluna apresentam diferenças estatisticamente significativas ( $p \leq 0,05$ ).*

- Conteúdo em polissacarídeos

Relativamente ao conteúdo em celulose, verificou-se que o resíduo com teor significativamente mais elevado é o CITRI B ( $50,2 \pm 2,3\%$  m/m), seguido pelo resíduo homogéneo CMC ( $43,1 \pm 0,2\%$  m/m) e pelo restante resíduo heterogéneo, CITRI A ( $35,5 \pm 4,9\%$  m/m).

Em termos de análise composicional, que raramente é aplicada a CDR na literatura (Yaman & Haykiri-acma, 2016), vale a pena lembrar que os teores de cada um dos parâmetros aqui estudados dependem fortemente da origem e diversidade de materiais que compõem um CDR. Assim, os díspares resultados obtidos para os resíduos CITRI A e CITRI B na análise composicional não são de estranhar, se considerarmos que foram recolhidos em alturas de tempo diferentes, o que influencia a variedade e percentagem dos materiais neles presentes. Ainda assim, verificou-se que, segundo Robinson e colaboradores (2016), o teor de celulose obtido para o resíduo CITRI B ( $50,2 \pm 2,3\%$  m/m) está de acordo com o intervalo relativo a CDR para o mesmo parâmetro (48,1 e 61,5% m/m) (Robinson, Bronson, Gogolek, & Mehrani, 2016). Apesar do menor teor obtido na amostra CITRI A ( $35,5 \pm 4,9\%$  m/m), o seu conteúdo em holocelulose ( $63,2 \pm 3,33\%$  m/m) encontra-se de acordo com os valores encontrados na literatura para este parâmetro em CDR (entre 54,0 e 62,3% m/m) (Cozzanij et al., 2006; Yaman & Haykiri-acma, 2016). O mesmo se aplica ao conteúdo em holocelulose do resíduo CITRI B ( $58,6 \pm 2,1\%$  m/m).

A diferença de resultados entre o conteúdo de celulose dos dois resíduos heterogéneos dever-se-á a uma maior presença de materiais ricos em celulose, ou seja materiais já processados como papel (de escritório, jornal e revista), têxteis ricos em algodão e/ou resíduos de madeira na amostra CITRI B (Byadgi & Kalburgi, 2016).

Relativamente ao resíduo CMC, os resultados obtidos para os teores de celulose ( $43,1 \pm 0,2\%$  m/m) e holocelulose ( $66,2 \pm 1,9\%$  m/m) estão de acordo com os encontrados na literatura para pó de pinho (40,2 a 50,1% m/m e 55,96% m/m a 71,6% m/m, respetivamente) (Bravo, Garcés, Faba, Sastre, & Ordóñez, 2017; Gong et al., 2016; Vázquez-guerrero et al., 2016).

- Conteúdo em lenhina

Relativamente ao teor de lenhina total, o resíduo que apresenta valor médio estatisticamente mais elevado é o CITRI B seguido pelo resíduo CITRI A, cujos valores ( $37,6 \pm 0,8\%$  m/m e  $29,5 \pm 4,0\%$  m/m, respetivamente) se situam acima do intervalo encontrado para este componente em CDR (14,0 e 27,4% m/m) (Cozzanij et al., 2006; Haykiri-açma & Yaman, 2016). Esta conclusão pode dever-se ao facto de que poderão estar presentes materiais com elevado conteúdo em lenhina, tais como pedaços de casca de troncos de árvores (Balat, 2011). Além disso, existe também a possibilidade de contaminantes metálicos ou poliméricos (materiais insolúveis) terem sido contabilizados nos cálculos gravimétricos realizados após a metodologia aplicada para determinação do teor em lenhina insolúvel. Outro fator importante a ter em consideração é o facto de a literatura referenciada não mencionar se o valor

apresentado corresponde à lenhina total ou apenas à lenhina insolúvel (“lenhina Klason”) (Tappi, 2011).

De referir que o resultado obtido para o conteúdo de lenhina insolúvel no resíduo CMC ( $27,1 \pm 1,8\%$  m/m) está de acordo com o intervalo encontrado para pó de pinho, para este específico componente (26,2 a 29,6% m/m) (Gong et al., 2016; Vázquez-guerrero et al., 2016).

- Conteúdo em extrativos

Os extrativos consistem em componentes que fazem parte da composição da biomassa lenhocelulósica e que são solúveis em solventes orgânicos, como etanol ou acetona. Visto que o processo de extração normalmente remove a maioria dos componentes solúveis em água, assim como compostos voláteis solúveis em solventes orgânicos, a solução resultante do processo apresentará gorduras, ceras, terpenos, ácidos e álcoois gordos, flavonóides, esteróis, taninos, entre outros. A sua quantidade depende do solvente utilizado na extração. Em geral, extrações com diclorometano apresentam menores quantidades de extrativos em comparação com as que utilizam acetona ou etanol e benzeno. Além disto, o conteúdo em extrativos está relacionado com a idade da amostra, a altura do ano em que foi recolhida e o seu nível de humidade (Buchanan, 2007).

Relativamente aos teores de extrativos, o resíduo com valor médio significativamente mais elevado foi o CITRI A ( $7,2 \pm 1,1\%$  m/m), seguido pela amostra CMC ( $4,6 \pm 0,1\%$  m/m) e por fim pelo resíduo CITRI B ( $3,8 \pm 1,5\%$  m/m). Num estudo efetuado por Yaman e Haykiri-acma, sobre um CDR com composição aproximada de 66% têxtil, 17% de papel e 13% derivados de plásticos, foi determinado um conteúdo de extrativos de 10,2% m/m (Yaman & Haykiri-acma, 2016). Este valor é, portanto, superior aos teores obtidos para os materiais heterogéneos considerados neste estudo. Relativamente ao pó de pinho e considerando o conteúdo de extrativos em gimnospérmicas, classe taxonómica da qual o pinheiro faz parte ( $3 \pm 2\%$  m/m) (Balat, 2011) considera-se que o teor de extrativos obtido para amostra de pó de pinho está inserido na gama de valores indicada por Balat.

- Balanço do potencial de produção para cada resíduo

Em conclusão, segundo os resultados obtidos na análise composicional, a amostra que terá maior rendimento na produção de bioetanol será o resíduo de pó de pinho, uma vez que apresenta maior razão holocelulose/lenhina ( $2,3 \pm 0,2\%$  m/m), significando um maior potencial de conversão em açúcares redutores, em detrimento de um menor conteúdo de lenhina. Logo de seguida, teoricamente, apresenta-se o resíduo CITRI A, com uma razão de ( $2,2 \pm 0,4\%$  m/m) e, por fim, pelo restante resíduo heterogéneo, CITRI B ( $1,6 \pm 0,1\%$  m/m).



Esta afirmação é apenas teórica dado que, durante a aplicação de pré-tratamentos há, na grande maioria dos tipos de pré-tratamento, degradação e/ou remoção de celulose (Gao et al., 2013; Zabed et al., 2016). Além disso, os diferentes tipos de pré-tratamento atuam com distintos níveis de severidade nos componentes da parede celular da biomassa, ou seja, celulose, hemiceluloses e lenhina (Conde-Mejía et al., 2012). Exemplificando, o pré-tratamento com ácido diluído tem efeito significativo ao nível das hemiceluloses, apresentando elevadas taxas de solubilização/hidrólise deste componente, além de conferir uma elevada produção de monossacarídeos a partir das hemiceluloses (Gírio et al., 2010; Nathan Mosier, Wyman, et al., 2005). Por outro lado, este pré-tratamento não apresenta um efeito tão significativo na remoção da lenhina, alterando apenas a sua estrutura (Aditiya et al., 2016; Nathan Mosier, Wyman, et al., 2005; Zabed et al., 2016).

#### 4.1.5. Açúcares totais e açúcares redutores

Os resultados apresentados na tabela 4.5 correspondem aos valores médios e desvios-padrão obtidos relativos às concentrações de açúcares totais e redutores em cada uma das amostras.

Tabela 4.5 - Conteúdo em açúcares totais e redutores dos resíduos.

Amostra	Açúcares totais (mg <sub>equivalente glucose</sub> ·L <sup>-1</sup> )	Açúcares redutores mg <sub>equivalente glucose</sub> ·L <sup>-1</sup> )
CITRI A	940,1 ± 62,9 <sup>a</sup>	724,2 ± 43,8 <sup>a</sup>
CITRI B	1006,4 ± 89,1 <sup>a</sup>	632,8 ± 120,6 <sup>a</sup>
CMC	2012,1 ± 357,5 <sup>b</sup>	1743,9 ± 277,1 <sup>b</sup>

*Nota: Valores classificados com letras diferentes na mesma coluna apresentam diferenças estatisticamente significativas ( $p \leq 0,05$ ).*

O termo “açúcares totais” inclui monossacarídeos, oligossacarídeos e polissacarídeos. A comparação do teor em açúcares totais dá uma noção de qual o resíduo que apresenta maior teor de matéria convertível em açúcares, ou seja, que conseguirá um maior rendimento em bioetanol, se todo esse material ficar disponível para a fermentação. Em materiais lenhocelulósicos, o teor de açúcares totais corresponde, sensivelmente, ao teor de holocelulose (celulose e hemiceluloses), pois são estes dois constituintes da matéria-prima que, após a lenhina ter sido removida no pré-tratamento, são hidrolisados em monómeros de hexoses e pentoses. Estes, por sua vez, sofrerão a ação de leveduras no processo de fermentação, produzindo assim bioetanol. No entanto, visto que os açúcares totais representam o conteúdo em açúcares simples, pares ou cadeias de monómeros, este parâmetro não revela a quantidade de unidades monoméricas de açúcar, que realmente irão ser convertidas em combustível. Assim, há que fazer outra análise, indicadora da quantidade de monómeros de glucose e xilose presentes na amostra – a determinação do teor em açúcares redutores.

Os açúcares redutores são geralmente descritos como qualquer açúcar que, em solução básica, apresenta um grupo carbonilo livre, de modo a permitir ao açúcar atuar como agente

reduzidor (Kunz, Lee, Schiwek, Seewald, & Methner, 2011). Os açúcares redutores contidos na celulose são os monômeros de glucose, enquanto que nas hemiceluloses existem vários monômeros com capacidade redutora, como pentoses (xilose, arabinopirranose e arabinofuranose) e hexoses (glucose, manose e galactose) (Sun et al. 2010; Zayed et al. 2016). Quanto maior a concentração em açúcares redutores maior será, teoricamente, o rendimento no processo de fermentação, uma vez que são estes os açúcares que serão convertidos em bioetanol.

Pela tabela 4.5, é possível verificar que o resíduo que apresenta maior teor de açúcares totais e redutores é o pó de pinho, CMC ( $2012,1 \pm 357,5 \text{ mg.L}^{-1}$  e  $1743,9 \pm 277,1 \text{ mg.L}^{-1}$ , respetivamente). Este resultado já era esperado, dada a análise composicional deste resíduo, onde se observa que, de entre as três amostras, o mesmo apresenta maior conteúdo em holocelulose. Relativamente aos resíduos heterogêneos, a amostra CITRI B apresenta maior conteúdo em açúcares totais ( $1006,4 \pm 89,1 \text{ mg.L}^{-1}$ ) enquanto o CITRI A apresenta um valor médio respeitante a açúcares redutores superior ( $724,2 \pm 43,8 \text{ mg.L}^{-1}$ ). No entanto, a análise de variância corroborou que, para ambos os tipos de açúcar, os resultados obtidos para os resíduos heterogêneos não apresentam diferenças estatisticamente significativas. Dado que o teor de açúcares redutores em papel de escritório é de  $140 \text{ mg.L}^{-1}$  e em cartão e papel de jornal é de  $110 \text{ mg.L}^{-1}$  (Balat, 2011) é possível assumir que estes resíduos heterogêneos apresentam como material celulósico, mais do que este tipo de material, uma vez que os valores de açúcares redutores se situam entre estes e os apresentados para o resíduo de pinho.

Concluindo, pelos resultados acima obtidos e corroborados pela análise composicional, o resíduo cuja fermentação conseguirá, em teoria, maior rendimento é o de pó de pinho CMC. No entanto, esta afirmação é apenas teórica uma vez que, como já referenciado, o modo de atuação do pré-tratamento selecionado pode diferenciar entre biomassas.

## 4.2. Pré-tratamentos

Os diferentes pré-tratamentos alcalinos incluíram soluções de KOH aquoso, KOH metanólico e soluções aquosas de cinzas de biomassa de forma a avaliar o seu efeito na decomposição da estrutura terciária dos materiais lenhocelulósicos através do tratamento dos resíduos por aquecimento a refluxo em três ciclos consecutivos. As figuras 4.1 a 4.3 ilustram, respetivamente, as frações líquidas e sólidas resultantes desses refluxos.

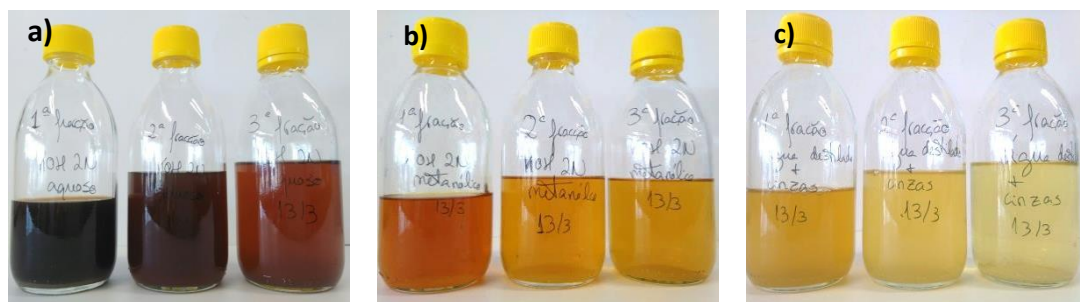


Figura 4.1 - Frações líquidas resultantes do pré-tratamento aplicado ao resíduo CITRI A com (a) KOH aquoso; (b) KOH metanólico; (c) Água destilada e cinzas de biomassa.

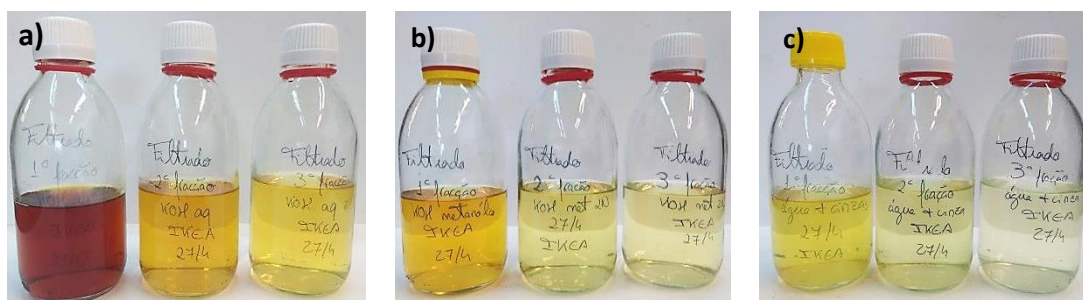


Figura 4.2 - Frações líquidas resultantes do pré-tratamento aplicado ao resíduo CMC com (a) KOH aquoso; (b) KOH metanólico; (c) Água destilada e cinzas de biomassa.

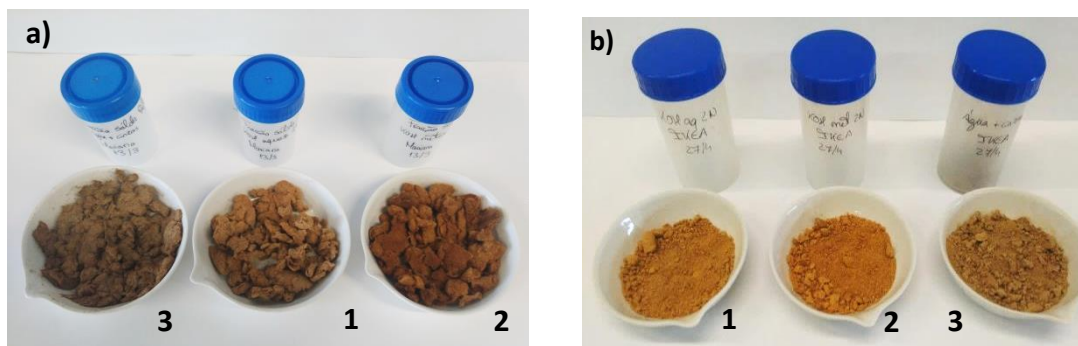


Figura 4.3 - Frações sólidas da biomassa (a) CITRI A e (b) CMC após pré-tratamento com (1) KOH aquoso; (2) KOH metanólico; (3) Água destilada e cinzas.

Relativamente aos pré-tratamentos ácidos, são de seguida apresentadas as frações líquidas correspondentes a cada tipo de matéria-prima e resultantes de cada ensaio. Assim, ilustram-se as soluções resultantes do ensaio onde se variou a concentração do ácido, o tempo e a temperatura de reação (figura 4.4).

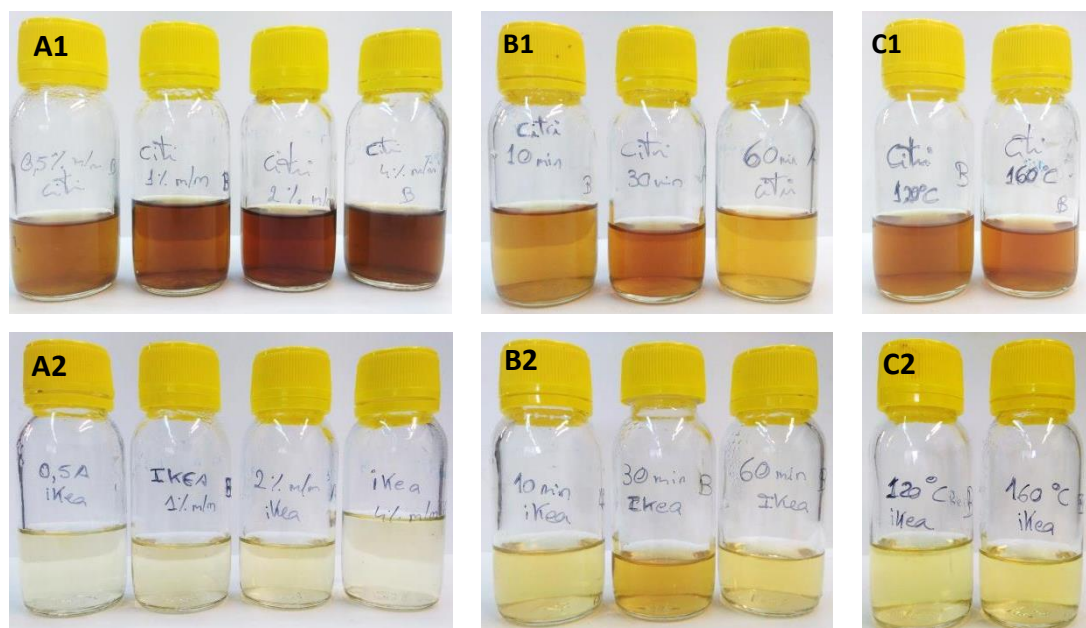


Figura 4.4 - Frações líquidas resultantes dos ensaios de pré-tratamento ácido com variação de (a) concentração do ácido; (b) tempo de residência; (c) temperatura de reação. 1- CITRI A, 2- CMC.

Relativamente às frações sólidas originadas nos ensaios deste tipo de pré-tratamento, as mesmas apresentavam sensivelmente a mesma coloração e dimensão granular, pelo que se ilustra na figura 4.5, o aspeto geral das mesmas, para as biomassas CITRI A e CMC, respetivamente.



Figura 4.5 - Aspeto geral dos resíduos sólidos da biomassa CITRI A (esquerda) e CMC (direita), após pré-tratamentos ácidos.

Relativamente ao pré-tratamento com água líquida sobreaquecida (temperatura e tempo de reação de 122°C e 4 h), ilustra-se, na figura 4.6, as frações líquidas resultantes da biomassa CITRI A e CMC. A figura 4.7 exhibe o aspeto da fração sólida obtida neste tipo de pré-tratamento.



Figura 4.6 - Frações líquidas das biomassas CITRI A (líquido com coloração negra) e CMC (líquido alaranjado) resultantes do tratamento com água líquida sobreaquecida.



Figura 4.7 - Aspeto das frações sólidas das biomassas CITRI A (esquerda) e CMC (direita), resultantes do tratamento com água líquida sobreaquecida.

#### 4.2.1. Composição da fração sólida após pré-tratamento

O resíduo recuperado após o pré-tratamento é o material que será utilizado na fase seguinte de hidrólise ácida. Este resíduo sólido é constituído por uma fração maioritariamente celulósica, apresentando também uma concentração significativa de hemiceluloses, já que são estes os componentes que restam na amostra pré-tratada, após a lenhina ter sido removida.

O teor de polissacarídeos que resta no resíduo depende do modo de atuação do catalisador utilizado no pré-tratamento, assim como as condições físico-químicas que determinam a severidade e extensão da reação. Embora não seja desejável, a degradação da celulose e das hemiceluloses ocorre em alguma extensão, na grande maioria dos pré-tratamentos (Gao et al., 2013). Assim, é espectável que a composição das frações obtidas após cada ensaio de pré-tratamento realizado varie não só entre o tipo de processo (alcalino, ácido ou hidrotérmico) mas também dentro de cada grupo, em função das condições de concentração, tempo, pressão e temperatura utilizadas.

Neste contexto, apresentam-se de seguida os resultados obtidos após aplicação do método de Kürschner-Hoffer ao resíduo heterogéneo CITRI A e ao resíduo de pó de pinho CMC, no intuito



de determinar o teor de celulose (% m/m) que permaneceu na fração sólida após cada ensaio de pré-tratamento.

#### 4.2.1.1. Recuperação de celulose

Foi realizada uma análise de variância (ANOVA Unidirecional) para os diferentes ensaios de pré-tratamento (alcalinos, hidrotérmico e variação de concentração, tempo e temperatura de operação nos pré-tratamentos ácidos). É também apresentada uma comparação entre os ensaios realizados, onde foi feita uma análise de variância unidireccional para cada tipo de resíduo.

##### 4.2.1.1.1. Pré-tratamentos alcalinos

A figura 4.8 apresenta os resultados obtidos na determinação do teor de celulose da fração sólida resultante de cada pré-tratamento alcalino.

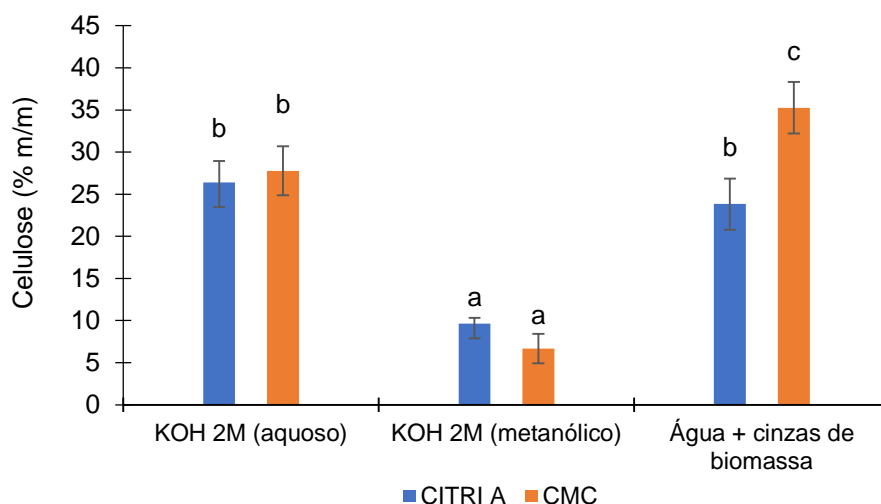


Figura 4.8 - Teor de celulose (% m/m) após pré-tratamentos alcalinos. Barras da mesma cor classificadas com letras diferentes apresentam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ).

É possível verificar que os pré-tratamentos alcalinos tiveram uma baixa recuperação de celulose, o que pode ter explicação na solubilização da mesma e consequente formação de oligo-, di- e/ou monossacarídeos (glucose). Esta hipótese é apoiada pelo facto dos pré-tratamentos em biomassas lenhocelulósicas serem fortemente influenciados consoante as condições de reação (Karimi et al., 2006). O facto de se utilizar uma solução alcalina com elevada concentração (2 M), elevadas temperaturas conjugadas com tempos de extração consideráveis (3 ciclos consecutivos de 60 minutos), superiores ao que normalmente são utilizados (Adekunle et al., 2016; Conde-Mejía et al., 2012; S Sun et al., 2016), conduziu a um conjunto de condições severas que potencializou a extração, agravando/intensificando os efeitos que os pré-tratamentos alcalinos têm – remoção da lenhina e hemiceluloses (Aditiya et al., 2016; P. Kumar et al., 2009; Menon & Rao, 2012; S Sun et al., 2016; Zabed et al., 2016) e

aumento da área superficial disponível (Aditiya et al., 2016; Alvira et al., 2010; P. Kumar et al., 2009; Menon & Rao, 2012; Zabed et al., 2016). Por sua vez, a este aumento de área superficial, subentende-se uma maior acessibilidade à celulose e assim capacidade de atuação do catalisador sobre esta (hidrólise) (Menon & Rao, 2012).

A seleção de condições de pré-tratamento alcalino mais severas foi motivada pela natureza heterogénea dos resíduos e nomeadamente a contaminação polimérica dos resíduos CITRI A e CITRI B. Pretendeu-se assegurar que conseguiriam ultrapassar alguns efeitos de matriz que influenciavam negativamente o rendimento, mas os resultados obtidos indicam que, nestas condições, a holocelulose é extensivamente solubilizada pelo que será desejável utilizar concentrações de base mais moderadas bem como condições de temperatura e tempo menos severas.

De notar que a explicação referida é também apoiada pelos elevados teores de compostos fenólicos totais obtidos na fração líquida dos pré-tratamentos alcalinos. Como exposto nesta seguinte secção, quando há uma elevada solubilização dos polissacarídeos (celulose e hemiceluloses), a formação de produtos inibidores (como os compostos fenólicos resultantes da remoção e degradação da lenhina) é potencializada consoante a severidade da reação (Harmsen & Huijgen, 2010).

Esta explicação significa também que estas frações sólidas pré-tratadas, ao serem submetidas a uma etapa de hidrólise ácida, teriam o desfecho provável de formar compostos inibidores à fermentação (Jönsson & Martín, 2016; Karimi & Taherzadeh, 2016), dado que nesta fração sólida já se encontram, consoante acima referido, componentes resultantes da solubilização da celulose, como oligossacarídeos, dissacarídeos e/ou hexoses (figura 4.9).

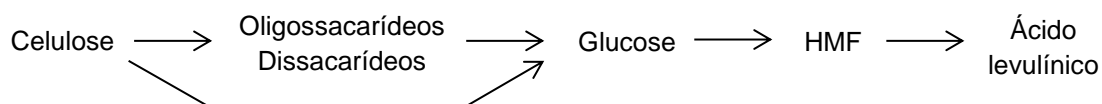


Figura 4.9 - Produtos de degradação da celulose em condições ácidas (adaptado de Karimi et al. 2006).

Dentro das condições reacionais aplicadas neste pré-tratamento, nomeadamente tempo e temperatura, a extração com maior recuperação de celulose foi a que utilizou a mistura de cinzas de biomassa e água destilada ( $1 \text{ g.}150 \text{ mL}^{-1}$ ) para o resíduo de pó de pinho. Este tipo de catalisador de carácter alcalino representa uma valorização de resíduos, dado que as cinzas foram retiradas de sistema de combustão de biomassa.

O resíduo sólido que apresentou menor teor de celulose (9,6 e 6,7% m/m de recuperação para a amostra CITRI A e CMC, respetivamente) foi o resultante do tratamento com hidróxido de

potássio metanólico. Isto significa, de acordo com a explicação acima apresentada, que este tipo de solução tem um efeito extrativo mais significativo do que a solução de hidróxido de potássio aquoso (solução comum) (cujos teores de celulose nas frações pré-tratadas foram 26,4% m/m para o resíduo CITRI A e 27,8% m/m para o CMC). Visto que ambos os catalisadores foram usados na mesma concentração (2 M) e condições de operação é válido assumir que o fator decisivo é o metanol ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ). Apesar de, em solução, o KOH aquoso apresentar o íon hidróxido ( $\text{OH}^-$ ) como base forte, o KOH metanólico dá origem ao íon metóxido ( $\text{CH}_3\text{O}^-$ ) uma base muito forte, com grande afinidade por átomos de carbono com dipolos positivos (carbocatiões) o que os torna particularmente reativos com a matriz celulósica (Luc, 1999).

#### 4.2.1.1.2. Pré-tratamentos ácidos

As figuras 4.10 e 4.11 apresentam os teores de celulose contidos nos resíduos sólidos após os ensaios de pré-tratamentos ácidos, onde se variou a concentração de ácido sulfúrico, o tempo de residência e a temperatura de reação, respectivamente.

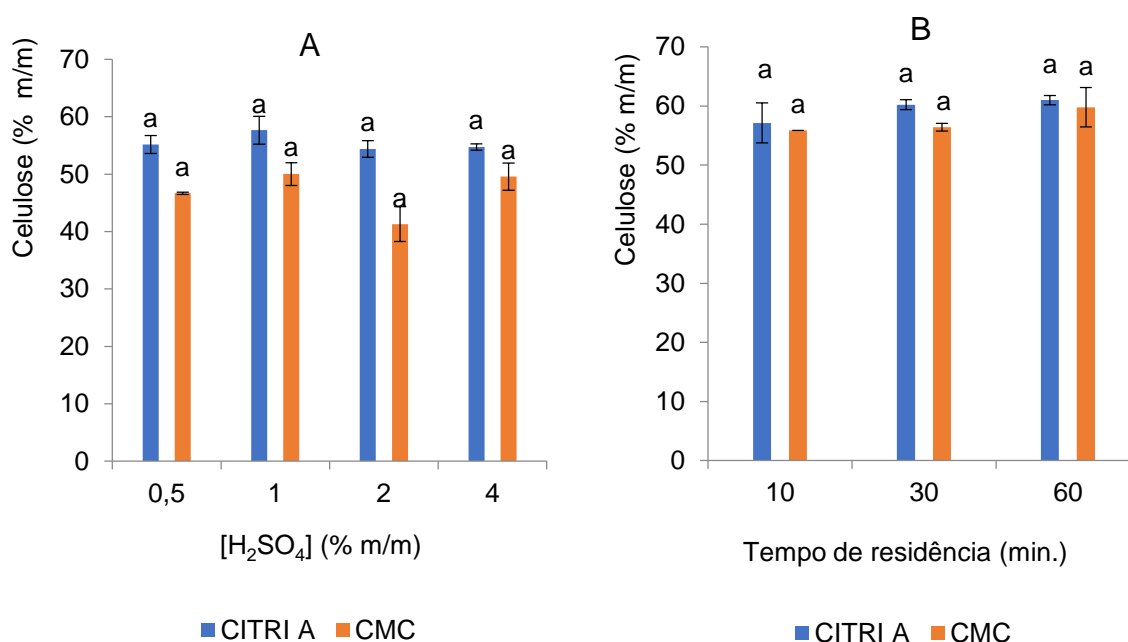


Figura 4.10 - Teor de celulose (% m/m) após ensaios de pré-tratamento onde se fez variar A) a concentração do ácido (tempo de residência de 30 minutos, temperatura = 160 °C) e B) o tempo de residência, (concentração de ácido sulfúrico de 1% m/m, temperatura = 160 °C). Barras da mesma cor classificadas com letras diferentes apresentam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ).



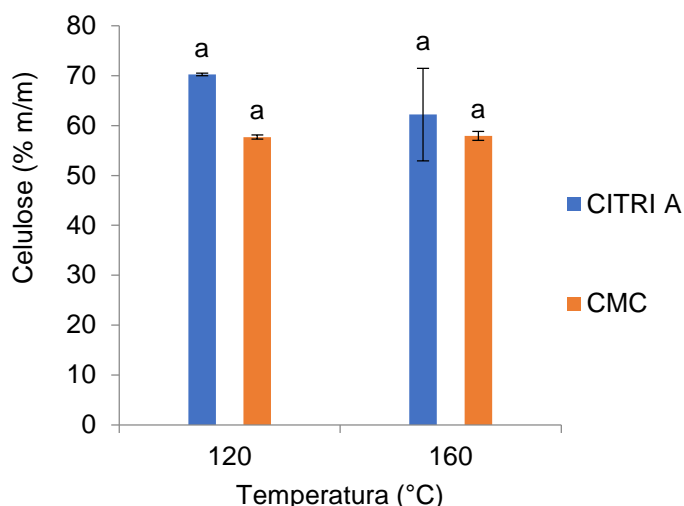


Figura 4.11 - Teor de celulose (% m/m) após ensaios de pré-tratamento ácido onde se fez variar a temperatura de reação. As restantes condições de ensaio consistiram numa concentração de ácido de 1% m/m e num tempo de residência de 30 minutos. Barras da mesma cor classificadas com letras diferentes apresentam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ).

Pela figura 4.10 acima apresentada, torna-se claro que, para aquelas condições de reação, a variação da concentração diluída do ácido sulfúrico não foi um fator decisivo na recuperação de celulose, dado que não se observam diferenças estatisticamente significativas entre as diversas concentrações de ácido, para nenhum dos resíduos. Ainda assim, observa-se que, tanto para o resíduo heterogêneo como para o pó de pinho, a concentração com a qual se conseguiu um maior conteúdo de celulose foi de 1% m/m ( $57,6 \pm 2,4\%$  m/m e  $50,0 \pm 2,0\%$  m/m, respetivamente). Também a concentração com a qual foi atingida uma menor recuperação foi a mesma, nomeadamente 2% m/m ( $54,4 \pm 1,5\%$  m/m para o resíduo CITRI A e  $41,3 \pm 3,0\%$  m/m para o resíduo CMC). Quando se utilizou uma concentração de 4% m/m de ácido sulfúrico, a recuperação da celulose foi bastante semelhante à obtida com 1% m/m, ou seja, nesta gama de concentrações, o ácido sulfúrico apresentou uma capacidade constante de solubilização da lenhina. No entanto, não é aconselhado o aumento da concentração para valores superiores a 4%, uma vez que vários autores defendem que as concentrações de ácido que permitem maiores rendimentos de reação nos pré-tratamentos com ácido diluído são inferiores a 4% m/m (Adekunle et al., 2016; V. B. Agbor et al., 2011; Scheper T. & Olsson L., 1979).

Irfan e colaboradores (2016) testaram qual a concentração ideal de ácido sulfúrico, para o pré-tratamento de biomassa de agulhas de pinheiro. Estes autores realizaram ensaios com concentrações de ácido sulfúrico de 0,5, 1,0 e 1,5%, à temperatura de 130 °C e com um tempo de reação de 75 minutos, tendo obtido um melhor rendimento de celulose com a concentração de 1% (Irfan, Nadeem, Syed, & Qazi, 2016). O resultado deste estudo está em concordância com os resultados apresentados na figura 4.10, apesar de se ter utilizado um menor tempo de residência (Irfan et al., 2016).

Na verdade, pela figura 4.10, é possível verificar que ao aumentar o tempo de residência, o rendimento de celulose também é aumentado para ambos os resíduos, indicando que a decomposição da lenhina foi favorecida pelo tempo de contacto. Assim, o maior teor celulósico foi obtido com 60 minutos de reação ( $61,0 \pm 0,8\%$  m/m e  $59,8 \pm 3,3\%$  m/m para CITRI A e CMC, respetivamente), enquanto o menor teor foi alcançado com um intervalo de 10 minutos ( $57,1 \pm 3,4\%$  m/m e  $55,9 \pm 0,0\%$  m/m, para CITRI A e CMC, respetivamente). No entanto, como não se observaram diferenças estatisticamente significativas nos ensaios de variação de tempo de residência, pelo que, por razões de ordem prática, o tempo de 30 minutos foi escolhido para a realização dos ensaios subsequentes de variação de temperatura de reação.

Nos ensaios de temperatura, observou-se que ocorria uma maior recuperação de celulose no pré-tratamento ácido realizado a  $120\text{ }^{\circ}\text{C}$  do que naquele realizado a  $160\text{ }^{\circ}\text{C}$  (mantendo-se a concentração de ácido sulfúrico a 1% e o tempo de contacto em 30 minutos). Nestas condições, a recuperação de celulose do resíduo CITRI A foi de  $70,2 \pm 0,2\%$  m/m enquanto a  $160\text{ }^{\circ}\text{C}$  a recuperação da celulose baixa para  $62,2 \pm 9,3\%$  m/m, o que indicia que à temperatura mais elevada deve iniciar-se alguma degradação da celulose, uma vez que não é muito expectável que a decomposição da lenhina diminua com o aumento de temperatura.

Este comportamento está de acordo com o que é relatado por vários autores: nos pré-tratamentos com ácido diluído, gamas de temperatura mais baixas (e.g.  $120\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) devem ser aplicadas em conjugação de maiores tempos de residência (30 – 90 minutos), enquanto gamas de temperatura mais elevadas (e.g.  $180\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) providenciam melhores rendimentos se conjugadas com menores tempos de operação (e.g. menos de 10 minutos) (Alvira et al., 2010; Zabed et al., 2016; Irfan et al., 2016).

É também observável que, em todos os ensaios de pré-tratamento ácido realizados, o resíduo CMC apresentou uma menor recuperação de celulose em comparação com o resíduo CITRI A, o que poderá ser explicado por um maior conteúdo de lenhina no primeiro. Os resíduos da unidade de produção de CDR processam muitos materiais, como papel, cartão e tecidos, que apresentam elevado teor de celulose, pois apesar de derivados de matérias-primas lenhocelulósicas já foram processados através de metodologias que favorecem a eliminação da lenhina e consequente concentração da celulose. De facto, a aplicação de pré-tratamentos com ácido diluído tem sido amplamente mais utilizada em resíduos lenhocelulósicos agrícolas, gramineas em biomassa de angiospérmicas, devido precisamente ao menor teor de lenhina neste tipo de matérias-primas (F. Hu & Ragauskas, 2012; P. Kumar et al., 2009; Nathan Mosier, Wyman, et al., 2005; Zhu & Pan, 2010).

Elevados teores de recuperação de celulose e aumento da área superficial disponível após pré-tratamentos com ácido diluído constituem nos principais efeitos deste tipo de extração, pelo que já seriam esperados valores de recuperação de 50% ou superiores (Alvira et al., 2010; Gírio et al., 2010; Nathan Mosier, Wyman, et al., 2005). Os resultados de recuperação de celulose obtidos neste tipo de pré-tratamento foram muito superiores aos determinados após os

tratamentos alcalinos. Gírio e colaboradores afirmam que a recuperação de celulose após pré-tratamentos com ácido diluído é superior à obtida com extração alcalina (Gírio et al., 2010), pelo que se conclui que esta diferença entre pré-tratamentos ocorreria provavelmente mesmo com menor temperatura de reação e menor concentração de base.

Um estudo realizado por Hernández e colaboradores (2013) determinou, para vagens vazias de acácia-branca (*Moringa oleífera*), uma recuperação de celulose acima de 87%, após um pré-tratamento ácido, a 190 °C durante 30 minutos (Hernández et al., 2013). Tratando-se de uma biomassa pertencente à classe angiospérmica, não é de estranhar este elevado valor, dado que este tipo de biomassa apresenta teores de lenhina muito inferiores aos apresentados nos três resíduos presentemente estudados. Cotana e colaboradores (2014) conseguiram uma recuperação de celulose acima de 66,86%, ao submeter lascas de pinho a um pré-tratamento de explosão a vapor (Cotana et al., 2014).

#### 4.2.1.1.3. Pré-tratamento hidrotérmico

A figura 4.12 apresenta os resultados obtidos na determinação do teor de celulose da fração sólida resultante do pré-tratamento hidrotérmico (água líquida sobreaquecida a 122 °C durante 4 horas).

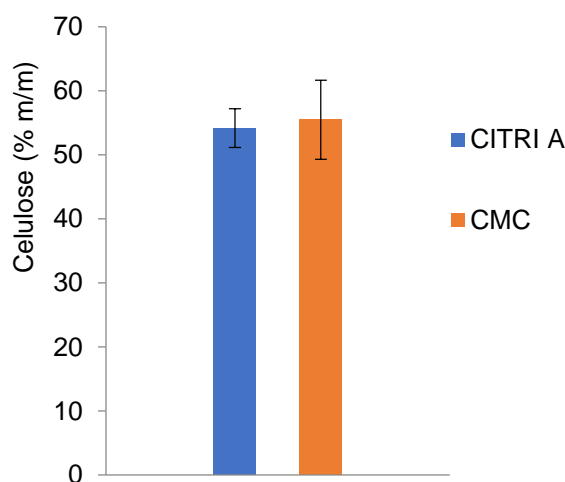


Figura 4.12 - Teor de celulose (% m/m) após pré-tratamento hidrotérmico.

O pré-tratamento com água líquida sobreaquecida teve resultados semelhantes aos pré-tratamentos com ácido diluído, uma vez que também apresenta uma recuperação considerável da celulose e elevada solubilização das hemiceluloses. As principais diferenças entre os efeitos dos pré-tratamentos consistem na remoção da lenhina por parte do tratamento hidrotérmico (e não na alteração da sua estrutura, como acontece com tratamento de ácido diluído) (Aditiya et al., 2016; Gírio et al., 2010; Zabed et al., 2017). Por outro lado, o tratamento hidrotérmico é menos suscetível de conduzir à formação de inibidores, ou de suscitar

problemas significativos de corrosão, ao contrário do que se passa com os pré-tratamentos com ácidos.

Relativamente aos resultados obtidos no pré-tratamento com água líquida sobreaquecida (figura 4.12), observam-se níveis de recuperação de celulose acima de 50%, nomeadamente  $54,2 \pm 3,0\%$  m/m para o resíduo CITRI A e  $55,5 \pm 6,2\%$  para o resíduo CMC. O que significa que este tipo de pré-tratamento chegou a superar a recuperação de celulose alcançada em algumas condições de operação testadas nos pré-tratamentos ácidos. Estes resultados são bastante promissores uma vez que o pré-tratamento hidrotérmico aplicado neste estudo foi realizado em condições de reação (temperatura de 122 °C, 4 h, pressão até 2,5 bar) mais suaves do que as gamas de temperatura (180 – 300 °C) e de pressão (1 MPa – 10 MPa) normalmente utilizadas nos estudos deste tipo de pré-tratamento (Gao et al., 2013; Jiang, Ge, Zhang, & Li, 2016; J. Liu et al., 2017; Lyu et al., 2017; Michelin & Teixeira, 2016; Yu et al., 2012; Zhuang et al., 2016). Em alguns casos é utilizada agitação magnética (300 – 600 rpm) e adição de azoto no sentido de aumentar o rendimento da reação o que acarreta um impacto negativo no balanço económico do processo (Hongdan, Shaohua, & Shubin, 2013; Jiang et al., 2016; Li, Jiang, Jia, & Xu, 2014; Lü et al., 2017; Lyu et al., 2017).

No entanto, na análise de eficiência de um pré-tratamento, é necessário comparar não só os teores de recuperação obtidos, mas também as condições de operação e custos inerentes ao processo, a fim de validar qual dos tipos de pré-tratamento apresenta maior razão entre a produtividade de bioetanol ( $\text{L.kg}^{-1}$ ) e o custo inerente a essa produção ( $\text{€}.\text{L}^{-1}$ ).

Tao e colaboradores (2011) realizaram uma análise económica à aplicação à escala industrial destes dois pré-tratamentos na biomassa lenhocelulósica de “switchgrass” (*Panicum virgatum*) (gramínea). A extração com água líquida sobreaquecida (LHW) foi realizada à temperatura de 200 °C, durante 10 minutos e numa proporção água:biomassa de 5:1. O pré-tratamento com ácido diluído (DA) (concentração entre 0,5 e 2%) foi aplicado à temperatura de 140 °C, durante 40 minutos e numa proporção solução ácida:água de 10:3. Esta análise, baseada numa simulação em que após cada pré-tratamento é aplicada a etapa de hidrólise enzimática e fermentação de glucose e xilose, concluiu que estes pré-tratamentos melhoram a eficiência mas contribuem para um aumento significativo dos custos do processo. Nomeadamente, ao nível do pré-tratamento com água líquida sobreaquecida, concluiu-se que apesar do preço do reator constituir uma pequena fração (18%) do custo total do pré-tratamento, o seu consumo em energia elétrica (0,6% superior ao consumo do DA) e a necessidade de elevadas quantidades de água são fatores determinantes no capital total de investimento e custos operacionais. Relativamente ao pré-tratamento com ácido diluído foi estipulado que o custo dos reatores industriais acarreta grande porção (76%) do custo total do pré-tratamento. Além disso, há ainda a necessidade de neutralizadores, o que significativamente o capital de investimento necessário (Tao et al., 2011).

Normalmente, o tipo de biomassa utilizado nesse estudo apresenta um menor conteúdo em lenhina ( $\approx 12\%$ ) do que os resíduos CITRI A e CMC, pelo que as condições de pré-tratamento indicadas teriam de ser otimizadas, no sentido de aumentar a severidade da reação. Dado que o custo de um pré-tratamento depende fortemente das condições do processo, nomeadamente da temperatura de reação, tempo de residência, carga de sólidos além das estratégias de recuperação e reciclagem de químicos (Tao et al., 2011), é de concluir um aumento de custo total de pré-tratamento se aplicado a matérias-primas com mais lenhina.

No processo total de produção de bioetanol, para atenuação/compensação dos custos envolvidos nos pré-tratamentos, é essencial a minimização de perda de açúcares (conversões eficientes e a utilização de açúcares das hemiceluloses), aumentar a concentração de sólidos com elevados teores de celulose e minimizar os custos de reatores de pré-tratamento. Neste contexto, têm sido desenvolvidos esforços no sentido de obter estirpes de leveduras e enzimas para uma desconstrução eficiente de hemiceluloses e sua utilização no processo fermentativo. Será assim possível, num passo seguinte, atingir um eficiente processo de utilização de hexoses e pentoses, com o potencial de, praticamente, duplicar a produção de bioetanol a partir de uma dada biomassa lenhocelulósica (Alvira et al., 2010).

#### **4.2.1.2. Comparação conjunta de todos os ensaios realizados**

Na figura 4.13 é apresentada a comparação entre os valores médios e respetivos desvios-padrão obtidos na determinação do teor de celulose em cada ensaio de pré-tratamento realizado.

Ao realizar uma análise de variância para cada tipo de resíduo, foi verificado que existem diferenças significativas entre os resultados obtidos nos diversos ensaios realizados para cada tipo de pré-tratamento. O ensaio que obteve o valor médio de celulose mais elevado para o resíduo CITRI A ( $70,2 \pm 0,2\%$  m/m), foi o que utilizou como catalisador ácido sulfúrico, a uma temperatura reaccional de  $120\text{ }^{\circ}\text{C}$ , numa concentração de 1% e num tempo de residência de 30 minutos. Assim, foram estas as condições selecionadas para efetuar o pré-tratamento antes de se realizar a etapa de hidrólise ácida.

Relativamente ao resíduo CMC, constituído por pó de pinho, o ensaio com maior valor médio de recuperação de celulose ( $59,8 \pm 3,3\%$  m/m) foi o pré-tratamento ácido com um tempo de residência de 60 minutos, concentração de 1 % e temperatura de  $160\text{ }^{\circ}\text{C}$ . No entanto, o ensaio final de pré-tratamento aplicado a este resíduo foi o mesmo que o do resíduo CITRI A, uma vez que a análise de variância do resíduo CMC revelou que não existem diferenças estatisticamente significativas entre estes dois ensaios.

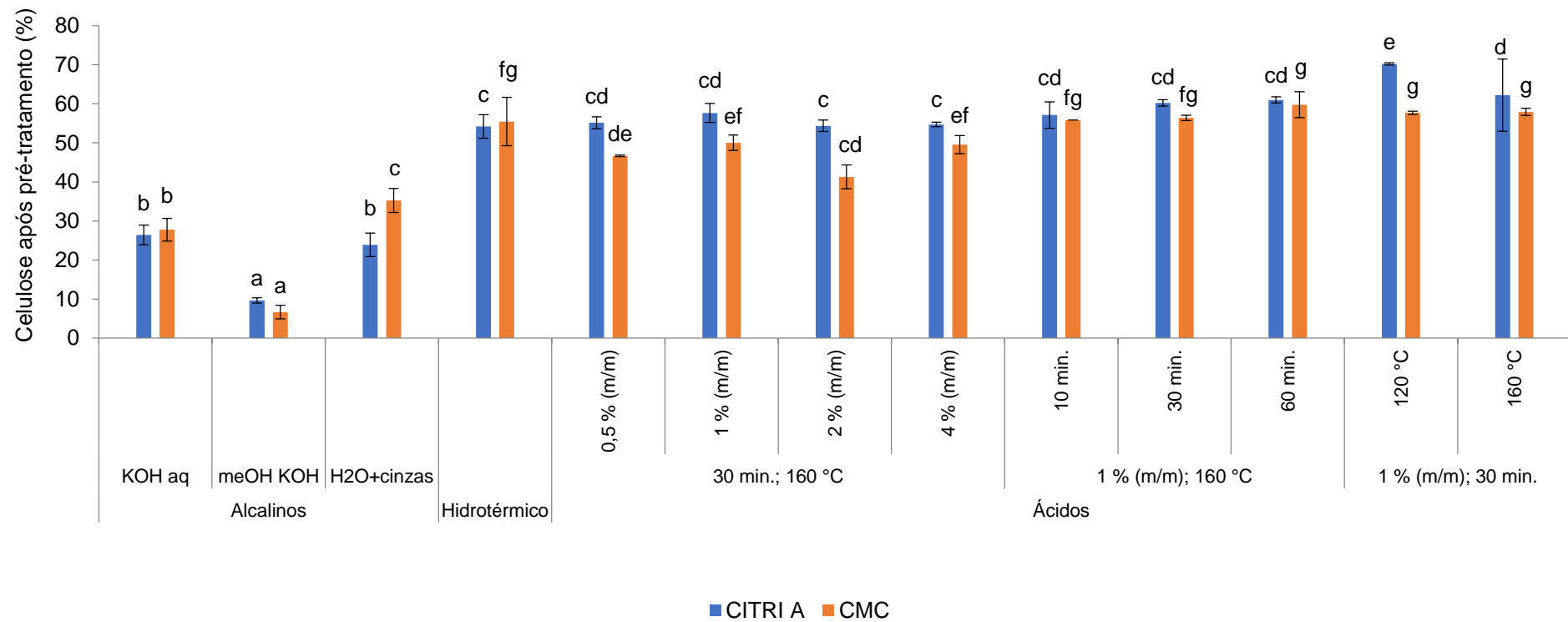


Figura 4.13 - Teor de celulose (% m/m) após todos os ensaios de pré-tratamento realizados. Barras da mesma cor classificadas com letras diferentes apresentam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ).

#### **4.2.2. Composição da fração líquida resultante do pré-tratamento**

A composição da fração líquida obtida em cada pré-tratamento varia entre amostras dependendo do tipo de matéria-prima, do modo de ação do catalisador usado e das condições físico-químicas aplicadas que determinaram a severidade da reação. Independentemente destes fatores, qualquer hidrolisado resultante de um pré-tratamento químico, físico-químico ou biológico apresenta majoritariamente lenhina na sua composição, já que é este o componente da biomassa que é removido ou estruturalmente modificado, e assim separado dos polissacarídeos, celulose e hemiceluloses.

##### **4.2.2.1. Determinação de compostos fenólicos totais**

O termo “compostos fenólicos” é utilizado para designar um grupo de compostos naturais em cuja estrutura se encontra, pelo menos, um anel benzênico ligado a um grupo hidroxilo, ou seja, um fenol. Englobados nesta designação, existem várias classes de compostos fenólicos, que diferem entre si consoante a sua estrutura química, nomeadamente o número de anéis fenólicos (e número de átomos de carbono), assim como as estruturas que ligam estes anéis entre si (Silveira, 2013).

Tendo em conta que a lenhina é constituída por 3 tipos de componentes fenólicos (álcoois p-cumarílico, coniferílico e sinapílico) (Menon & Rao, 2012), foi determinado o teor de compostos fenólicos totais em cada fração líquida resultante de cada ensaio, nos três diferentes tipos de pré-tratamento realizados. Esta determinação fornece, assim, a informação de qual pré-tratamento aplicado (alcalino, ácido ou hidrotérmico) apresentou maior capacidade de degradação da lenhina e portanto resultou numa maior separação entre a lenhina e os polissacarídeos, contribuindo assim para uma maior digestibilidade da celulose e, consequentemente, uma produção mais eficiente de etanol celulósico.

A figura 4.14 apresenta a comparação entre os resultados obtidos na aplicação do método de Folin-Ciocalteu a cada fração líquida resultante de cada ensaio de pré-tratamento. Foi realizada uma análise de variância (ANOVA Unidireccional) para cada resíduo, verificando assim a existência de diferenças estatisticamente significativas entre cada ensaio. Os resultados obtidos encontram-se expressos em mg de equivalentes de ácido gálico (EAG) por litro de hidrolisado após pré-tratamento ( $\text{mg EAG.L}^{-1}$ ).

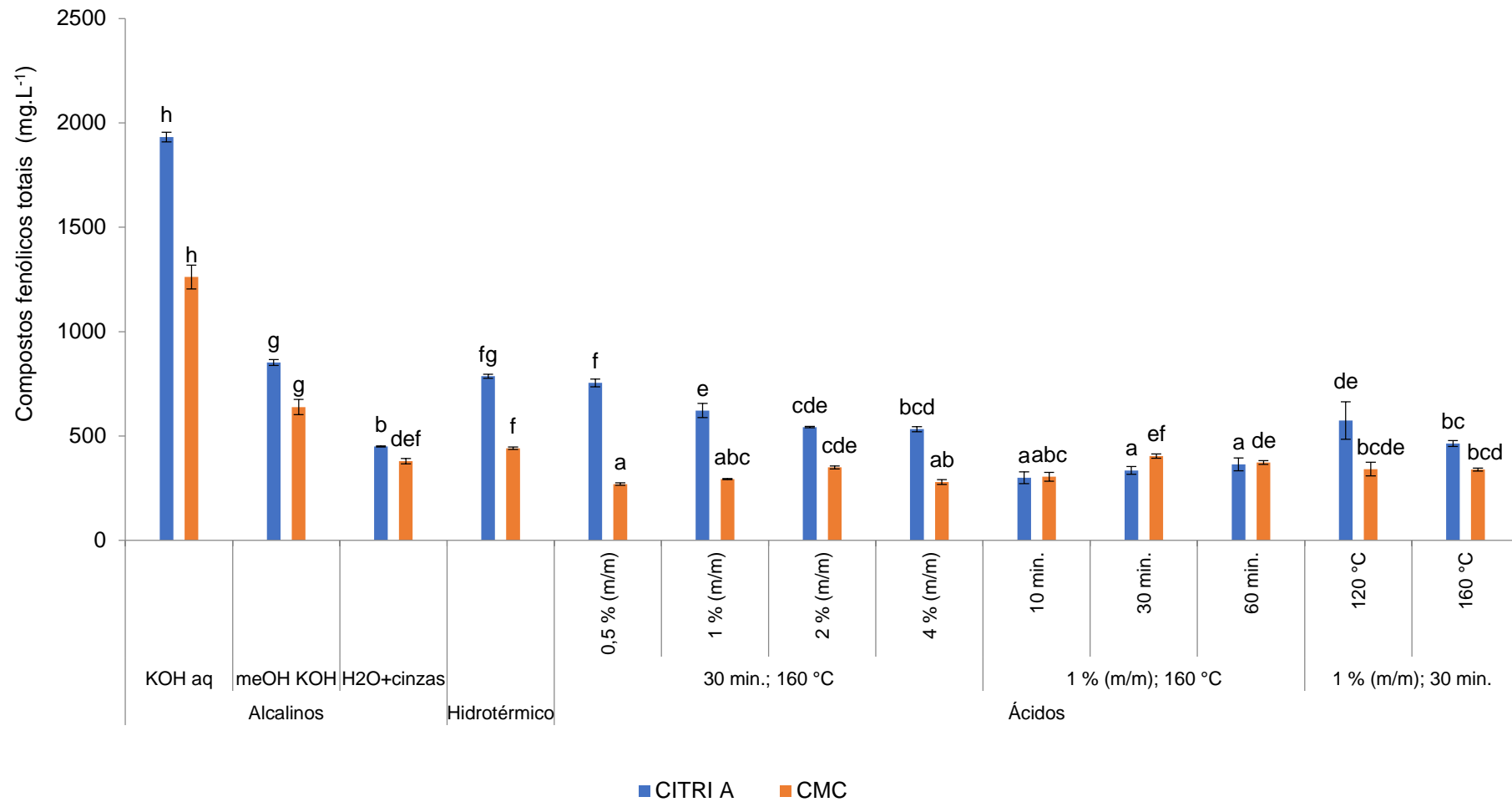


Figura 4.14 - Concentração de compostos fenólicos totais contidos nas frações líquidas após pré-tratamentos.



Pela figura 4.14 é possível verificar que as frações líquidas dos resíduos CITRI A e CMC que contêm maior concentração de compostos fenólicos são ambas resultantes do pré-tratamento alcalino com hidróxido de potássio aquoso como catalisador ( $1932,2 \pm 22,6$  mg EAG.L<sup>-1</sup> e  $1261,7 \pm 56,9$  mg EAG.L<sup>-1</sup>, respetivamente). De facto, estes resultados apresentam diferenças estatisticamente significativas comparativamente a todas as outras concentrações alcançadas por qualquer outro ensaio de pré-tratamento. Numa ordem decrescente, surgem logo de seguida, novamente para ambos os resíduos, as concentrações de fenólicos totais obtidas no ensaio com hidróxido de potássio metanólico ( $852,2 \pm 13,9$  mg EAG.L<sup>-1</sup> e  $638,9 \pm 36,1$  mg EAG.L<sup>-1</sup> para os resíduos CITRI A e CMC, respetivamente). Estes resultados estão de acordo com a explicação dada na secção 4.2.1.1.1. Dado que as extrações alcalinas têm como efeito a remoção da lenhina, e que estes pré-tratamentos foram realizados sob condições severas, é potencializada a degradação da lenhina e libertação dos compostos fenólicos e seus constituintes (Harmsen & Huijgen, 2010). A presença de compostos fenólicos em frações lenhocelulósicas resultantes de pré-tratamentos alcalinos é confirmada por Lawther e Sun (1996) (Lawther & Sun, 1996). Além disto, existe ainda a hipótese destas elevadas concentrações serem explicadas não só pela degradação da lenhina, mas também pelo efeito interferente que os açúcares redutores têm na reação de Folin-Ciocalteu. Esta reação é específica para compostos com capacidade redutora, o que significa que açúcares redutores presentes na fração líquida, como resultado da degradação de hemiceluloses e celuloses poderão ter sido contabilizados como compostos fenólicos.

Em comparação com as concentrações de compostos fenólicos alcançadas com o pré-tratamento de água líquida sobreaquecida, as obtidas nos ensaios com ácido diluído são menores. A explicação para estas concentrações, está no facto deste tipo de pré-tratamento não remover a lenhina como os restantes pré-tratamentos, mas atua no sentido de alterar a sua estrutura. Assim, é permitida separação entre a lenhina e as cadeias de celulose e hemicelulose, mas não causa a sua degradação com libertação das unidades fenólicas para a fase líquida (Aditya et al., 2016; Alvira et al., 2010; Menon & Rao, 2012; Nathan Mosier, Wyman, et al., 2005; Zabed et al., 2016). Deste modo, este tipo de pré-tratamento tem como resultado uma lenhina de baixa qualidade (Gírio et al., 2010). Ainda assim as concentrações obtidas estão muito semelhantes às apresentadas num estudo efetuado por Mitchell e colaboradores (2014). Neste trabalho, após submeter uma biomassa de pinho a um pré-tratamento com uma concentração de ácido sulfúrico de 1%, tempo e temperatura de reação de 60 minutos e 120 °C, foi alcançada uma concentração de compostos fenólicos totais de 292 mg.L<sup>-1</sup>. Nessa concentração, foram identificados para essa biomassa, vários tipos de compostos fenólicos, com maior expressão apresentada por 2-guaiacil acetaldeído, 3-guaiacilacetol, 1-guaiacilacetol e 3-(4-hidroxifenil)-acetol (Mitchell, Taylor, & Bauer, 2014).

Os compostos fenólicos presentes nas frações líquidas resultantes de ensaios em meios ácidos diferem consoante o tipo de biomassa e as condições de pré-tratamento (Jönsson & Martín, 2016). Alguns dos fenóis mais comumente formados durante pré-tratamentos ácidos de

madeira são o ácido 4-hidroxibenzoico, 4-hidroxibenzaldeído, vanilina, coniferil aldeído, ácido sirínico e diversas cetonas. Além dos compostos fenólicos, existem compostos não fenólicos aromáticos que podem resultar da degradação da lenhina, tais como ácido benzoico, álcool benzílico, ácido cinâmico, cinemaldeído, entre outros (Jönsson & Martín, 2016).

Alguns dos compostos fenólicos referidos apresentam valor comercial. Exemplificando, a vanilina e o aldeído sirínico são aromatizantes largamente utilizados na indústria alimentar, cosmética e farmacêutica (Wong, Chen, & Li, 2010); derivados do ácido cinâmico apresentam actividade antiproliferativa selectiva contra alguns tipos de células cancerígenas (Ling et al., 2015); os ésteres de ácido benzoico têm várias aplicações como conservantes em alimentos e bebidas, medicamentos, cosmética e produtos pessoais. Além disto podem ser usados em pomadas medicinais, no fabrico de sabores artificiais no tabaco e até como intermediários de corantes, na síntese de tintas e plastificantes (Chemical new seed, 2015; The Chemical Company, 2016).

### 4.3. Hidrólise ácida

Os resultados apresentados na tabela 4.6 apresentam os resultados obtidos após aplicação do pré-tratamento com ácido diluído aos resíduos estudados seguindo-se uma etapa de hidrólise ácida.

Tabela 4.6 - Teores de açúcares totais e redutores após pré-tratamento com ácido diluído.

Amostra	Açúcares totais (mg <sub>equivalente glucose</sub> .L <sup>-1</sup> )	Açúcares redutores (mg <sub>equivalente glucose</sub> .L <sup>-1</sup> )
CITRI A	1821,3 ± 4,7 <sup>a</sup>	1221,7 ± 202,1 <sup>a</sup>
CITRI B	2630,0 ± 40,3 <sup>c</sup>	2057,0 ± 40,0 <sup>c</sup>
CMC	5913,5 ± 69,7 <sup>b</sup>	4516,9 ± 181,6 <sup>b</sup>

*Nota: Valores classificados com letras diferentes na mesma coluna apresentam diferenças estatisticamente significativas ( $p \leq 0,05$ ).*

Pela tabela 4.6 é possível verificar que o resíduo CMC permanece, mesmo após o pré-tratamento, como a amostra com maior teor de açúcares totais e redutores (5913,5 ± 69,7 mg.L<sup>-1</sup> e 4516,9 ± 181,6 mg.L<sup>-1</sup>). No caso dos resíduos heterogêneos, o CITRI A é o que apresenta menor conteúdo em açúcares após pré-tratamento, tanto em açúcares totais (1821,3 ± 4,7 mg.L<sup>-1</sup>) como redutores (1221,7 ± 202,1 mg.L<sup>-1</sup>).

Num estudo efectuado por Moncada e colaboradores (2016), uma espécie de pinho foi tratada com ácido sulfúrico 1% v/v, pré-tratamento em autoclave, a uma temperatura e tempo de reação de 122 °C, numa razão sólido:líquido de 1:10, tendo-se obtido uma concentração em açúcares redutores de 20 g.L<sup>-1</sup> (Moncada, Cardona, Higuera, Vélez, & López-Suarez, 2016). Noutro estudo realizado por Larsson e colaboradores, ao submeter uma biomassa de pinácea

(também do tipo gimnospérmica, tal como o pinho) a uma solução de ácido sulfúrico de 0,5% m/m, temperatura e tempo operacionais de 150 °C e 30 minutos, obteve-se um total de açúcares totais (glucose, manose e xilose) de 12,4 g.L<sup>-1</sup> (Larsson et al., 1999). A justificação para estas diferenças relativamente aos resultados obtidos pode estar relacionada com diferenças nas condições de reação, nomeadamente tempo e temperatura de residência, concentração do ácido e a razão sólido:líquido.

No entanto, dado que nas biomassas originais, o resíduo CITRI A apresentava maior teor em açúcares redutores, é possível afirmar que o pré-tratamento teve um efeito mais acentuado no resíduo CITRI B, uma vez que o seu hidrolisado após pré-tratamento teve um maior aumento de açúcares redutores em comparação com o resíduo CITRI A. Este facto pode ter explicação na distribuição granulométrica de cada um. Uma vez que o resíduo CITRI B apresenta uma maior porção ( $\approx 80,2\%$ ) de partículas com tamanho inferior a 250  $\mu\text{m}$ , em comparação com o CITRI A ( $\approx 46,3\%$ ), o primeiro apresenta uma maior área superficial, permitindo assim um melhor contacto entre o catalisador (solução ácida) e as partículas do resíduo.

Comparando os teores de açúcares para os três resíduos, antes e após os pré-tratamentos (figura 4.15), é possível verificar que, para qualquer um dos três resíduos, o valor de açúcares aumentou acentuadamente. Isto significa que a aplicação do pré-tratamento teve o resultado desejado, uma vez que após a sua aplicação se deve conseguir que o catalisador possa aceder à celulose e hidrolisa-la nos seus correspondentes monómeros, isto é, glucose (açúcar redutor). De facto, vários autores (Bower, Wickramasinghe, Nagle, & Schell, 2008; Esteghlalian, Hashimoto, Fenske, & Penner, 1997; Hsu, Guo, Chen, & Hwang, 2010; Karimi et al., 2006; Saha et al., 2005; Söderström, Pilcher, Galbe, & Zacchi, 2003; Yat et al., 2008; Zhu & Pan, 2010) confirmam o benefício da aplicação de pré-tratamento com ácido diluído no aumento em açúcares em matérias-primas lenhocelulósicas.

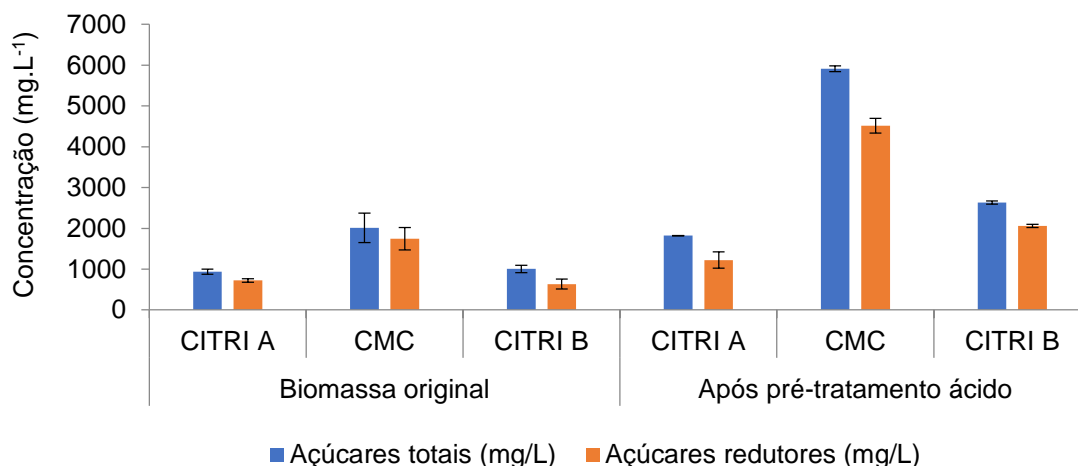
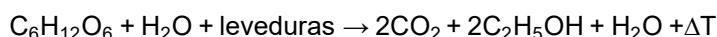


Figura 4.15 - Teor de açúcares totais e redutores nas biomassas originais e pré-tratadas.

#### 4.4. Potencial de produção de bioetanol nas condições estudadas

Após aplicação da hidrólise ácida à fração sólida de biomassa pré-tratada, é de seguida apresentada uma estimativa de rendimento em bioetanol para cada resíduo (tabela 4.7). De referir que os valores apresentados são baseados num rendimento teórico, onde numa reação típica de fermentação por uma levedura, a glucose é convertida em bioetanol de acordo com a reação seguinte:



Em teoria, cada 100 kg de glucose e xilose pode produzir 49 kg de dióxido de carbono e 51 kg de etanol (Zabed et al., 2017; Pasha et al., 2007). Durante a fermentação cerca de 95% de açúcares solúveis são convertidos em etanol e  $\text{CO}_2$ , 1% é convertido em matéria celular das leveduras e 4% é convertido noutros subprodutos solúveis, como o glicerol (Boulton et al., 1999). No entanto, em termos práticos, existem vários fatores que acabam por diminuir o rendimento desta conversão, nomeadamente temperatura (variável que afeta diretamente a taxa de crescimento dos microorganismos), pH (entre 2,8 e 4,3, é também um importante fator para a sobrevivência e crescimento das leveduras) e concentração de açúcares fermentáveis (concentração inicial de glucose vai influenciar seletivamente as estirpes de leveduras presentes durante a fermentação) (Md. Fakruddin et al., 2012; Noé Arroyo-López et al., 2009).

Tabela 4.7 - Rendimento teórico de bioetanol obtido para cada resíduo no seu estado original e após pré-tratamento.

Amostra		Massa de glucose no hidrolisado (mg)	Massa de etanol (mg)	Rendimento bioetanol (% $m_{\text{etanol}} / m_{\text{biomassa}}$ )
Original	CITRI A	93,9	47,9	9,6
	CITRI B	113,9	58,1	11,6
	CMC	313,9	160,1	32,0
Pré-tratada	CITRI A	867,4	442,4	11,1
	CITRI B	1830,7	933,7	23,3
	CMC	3184,4	1624,0	40,6

Comparando os rendimentos de bioetanol teoricamente alcançados pelas amostras antes e depois dos pré-tratamentos, verifica-se que todos os resíduos apresentariam um maior rendimento em bioetanol após sofrerem o pré-tratamento com ácido diluído (potencial de produção de bioetanol aumenta, aproximadamente, 14%, 21% e 50% para os resíduos CITRI A, CMC e CITRI B, respetivamente). Entre os três, o resíduo de pó de pinho, apresenta os maiores rendimentos de conversão (32,0% m/m e 40,6% m/m, na sua forma original e pré-tratada, respetivamente), enquanto o resíduo CITRI A apresenta os menores valores (9,6% m/m e 11,1% m/m, na sua forma original e pré-tratada, respetivamente).

Tal como especulado no comentário à análise composicional, o resíduo CMC apresenta o maior potencial, dado que apresentava maior razão holocelulose/lenhina ( $2,3 \pm 0,2\%$  m/m). No entanto, a mesma explicação não pode ser aplicada aos resíduos heterogêneos, dado que a amostra CITRI A ( $2,2 \pm 0,4\%$  m/m) apresentava maior razão que a CITRI B ( $1,6 \pm 0,1\%$  m/m). O facto de o resíduo CITRI B apresentar uma maior conversão em bioetanol, e uma maior diferença de rendimento teórico, antes e depois do pré-tratamento, pode ser explicado pelo seu superior teor em celulose (o que possibilita uma maior concentração em glucose) e pela distribuição granulométrica do mesmo. Isto é, o facto de ter uma maior quantidade de partículas de tamanho reduzido, fez aumentar a área superficial disponível, o que já não aconteceu com tanta expressão no resíduo CITRI A, mais homogêneo na distribuição de partículas.

Safari e colaboradores alcançaram um rendimento em bioetanol de 5,8% com madeira de pinho antes de pré-tratamento e cerca de 54% após pré-tratamento alcalino, seguido de uma etapa de hidrólise enzimática (1% NaOH, 1 h, 180 °C) (Safari, Karimi, & Shafiei, 2017). Luo e colaboradores (2010) atingiram 69% do valor teórico de etano, com um tratamento com sulfito, seguido de hidrólise enzimática (Luo et al., 2010). Ballesteros e colaboradores (2004) submeteram uma palha de trigo a um processo integrado de sacarificação e fermentação simultâneas, atingindo um rendimento de 62,5%. Saucedo-Luna e colaboradores utilizaram 2% ácido sulfúrico a uma temperatura e tempo de reação de 151 °C e 10 minutos, para obter um rendimento de 48.5% a partir do bagaço da planta agave-azul (Saucedo-Luna, Castro-Montoya, Rico, & Campos-Garcia, 2010). Shuai e colaboradores (2010) obtiveram para a biomassa de *Picea* (uma gimnospérmica) um rendimento de 77%, ao usar um tratamento de explosão a vapor.

Dado que os rendimentos teóricos em bioetanol apresentados foram alcançados nas condições estudadas, poderá ainda ser possível aumentá-los se essas condições forem otimizadas. Nomeadamente, poder-se-ão testar outras combinações de parâmetros de pré-tratamento, como temperatura/tempo e carga de sólidos, além de tipo de reatores utilizados e testar uma hidrólise enzimática.

#### **4.5. Ensaios de adsorção**

A baixa granulometria deste tipo de resíduo lenhocelulósico confere-lhe uma área superficial elevada pelo que, se na superfície das suas partículas existirem grupos funcionais com capacidade de estabelecer ligações com metabolitos aniónicos ou catiónicos, o mesmo poderá ser utilizado como adsorvente industrial.

Existem diversos estudos que evidenciam a presença de grupos negativamente carregados na superfície de partículas de biomassa, sobretudo a valores pH neutros ou básicos (Hashemian, Ardakani, & Salehifar, 2013; Marković et al., 2015; Ozcan, Omeroğlu, Erdoğan, & Ozcan, 2007),

pelo que, geralmente, este tipo de materiais apresenta alguma capacidade de adsorção de analitos catiónicos, como alguns pigmentos inorgânicos e metais pesados.

Nesta etapa do trabalho, procurou-se avaliar a capacidade de adsorção do resíduo tal como recebido, isto é, na sua forma pulverizada, com composição lenhocelulósica e polimérica. Para isto, foi utilizado como analito modelo um pigmento catiónico, o azul-de-metileno (figura 4.16), bastante usado na indústria têxtil, farmacêutica, alimentar, entre outras (Mohammed, Shitu, & Ibrahim, 2014; Salleh, Mahmoud, Karim, & Idris, 2011).

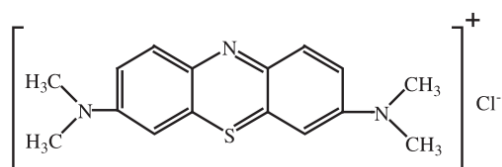


Figura 4.16 - Estrutura molecular do azul-de-metileno (adaptado de Jia et al., 2017).

Começou-se por estudar o efeito da dose de adsorvente, seguido pela variação da concentração de azul-de-metileno, tempo de contacto e variação do pH. Para explorar um pouco mais as potencialidades deste adsorvente de baixo custo, foi também avaliada a possibilidade de se poder recuperar o corante a partir do adsorvente, num ensaio de dessorção.

#### 4.5.1. Variação da dose de adsorvente

Os ensaios de adsorção onde se testou o efeito da dose de adsorvente foram realizados com uma concentração de azul-de-metileno de  $100 \text{ mg.L}^{-1}$  num tempo de contacto de 24 horas, em agitação “overhead” de 10 rpm. O aspeto visual das amostras após realização dos ensaios de variação de massa de adsorvente encontra-se relatado na figura 4.17.

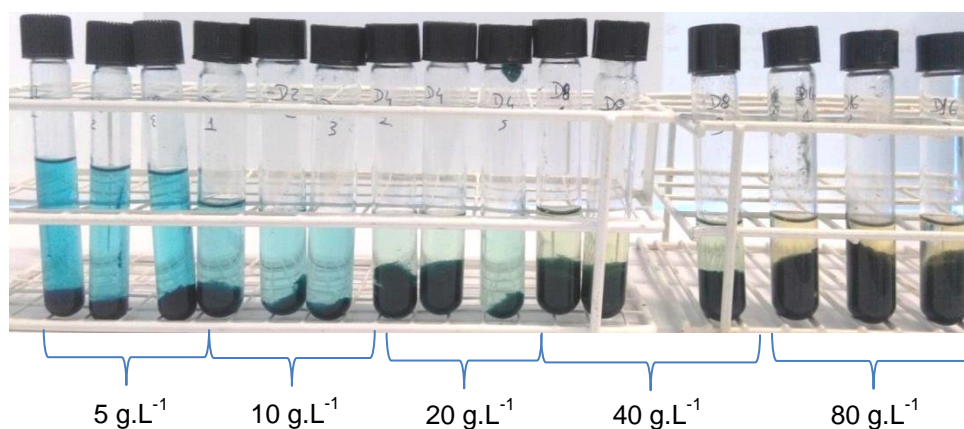


Figura 4.17 - Aspeto final dos ensaios onde se testou o efeito da dose de adsorventes ( $[MB]_0 = 100 \text{ mg.L}^{-1}$ ).

Na figura 4.18 é possível observar os resultados obtidos relativamente à eficiência de remoção (%) e à capacidade de adsorção ( $\text{mg.g}^{-1}$ ) calculadas para os ensaios de variação da dose de adsorvente.

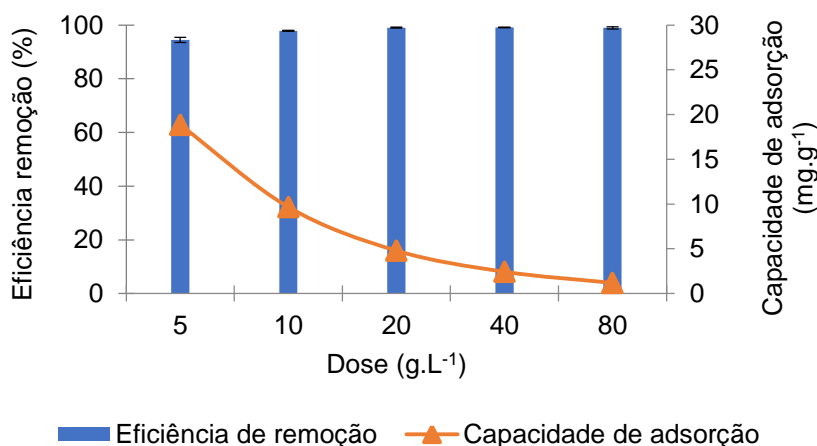


Figura 4.18 - Efeito da dose de adsorvente na eficiência de remoção e na quantidade adsorvida ( $n=3$ ).

Pela figura 4.18 é possível verificar que a eficiência de remoção foi, aproximadamente, igual ou superior a 98% para todas as doses iguais ou superiores a 10  $\text{g.L}^{-1}$ . A melhoria na remoção de azul-de-metileno em função da dose de resíduo deve-se ao facto de haver uma maior área superficial onde pode ocorrer a adsorção. Consequentemente, há maior possibilidade para as moléculas do analito serem adsorvidas, levando a uma adsorção superior em soluções com maiores doses.

Relativamente à capacidade de adsorção, a mesma diminui desde a dose de 5  $\text{g.L}^{-1}$  até 80  $\text{g.L}^{-1}$ , o que indica que para todas as concentrações superiores a 5  $\text{g.L}^{-1}$  existem locais de adsorção da superfície do adsorvente que não são ocupados pelo pigmento. No entanto, se se pretender maximizar a concentração de azul-de-metileno no adsorvente a eficiência de remoção diminuirá para valores inferiores a 95%.

Uma maior eficiência de remoção acompanhada pelo aumento da dose de resíduo encontra-se de acordo com resultados obtidos nos trabalhos de Shakoore e Nasar (2016) e de Marković e colaboradores (2015) que testaram a eficiência de remoção de azul-de-metileno com adsorvente produzidos a partir de casca de citrinos e de pêssago, respetivamente (Shakoore & Nasar, 2016; Marković et al. 2015).

Embora as doses de 20, 40 e 80  $\text{g.L}^{-1}$  apresentem eficiência de remoção aproximadamente 99%, foi escolhida a dose de 10  $\text{g.L}^{-1}$  para prosseguir com os ensaios de adsorção seguintes, dado que esta condição apresenta a melhor razão entre massa de adsorvente necessária e eficiência de remoção (aproximadamente 98%).

#### 4.5.2. Variação da concentração de azul-de-metileno

Os ensaios de adsorção onde se fez variar a concentração do azul-de-metileno foram realizados com uma dose de  $10 \text{ g.L}^{-1}$ , num tempo de contacto de 24 horas, em agitação “overhead” de 10 rpm. O aspeto final das amostras após adsorção encontra-se descrito na figura 4.19.

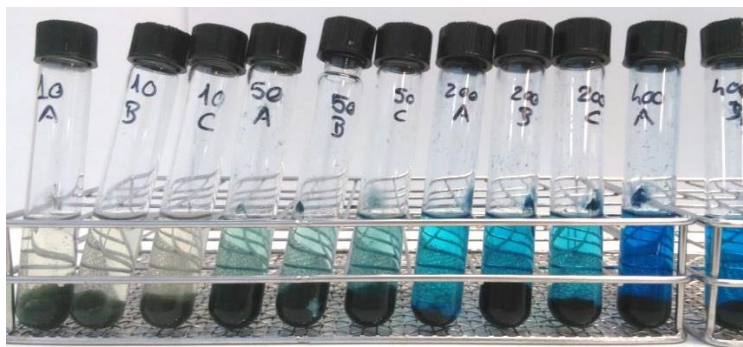


Figura 4.19 - Aspeto final dos ensaios onde se testou o efeito da variação da concentração de azul-de-metileno.

Na figura 4.20 observam-se os resultados obtidos relativamente à eficiência de remoção (%) e à capacidade de adsorção ( $\text{mg.g}^{-1}$ ) calculadas para os ensaios de variação da concentração de azul-de-metileno na solução inicial.

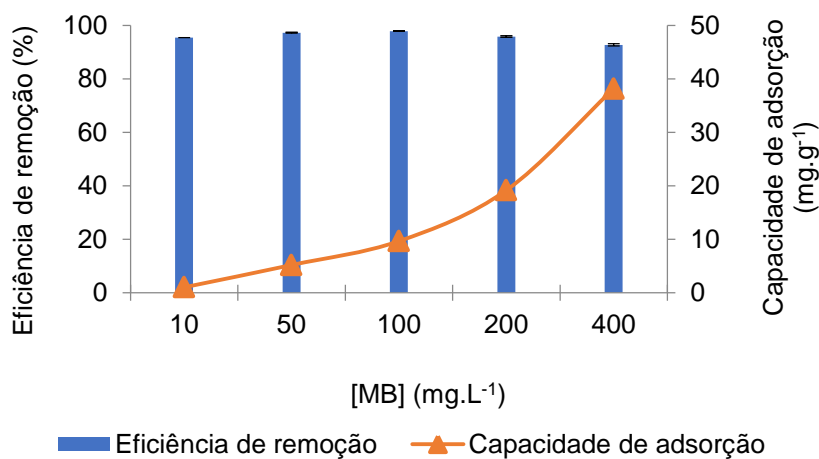


Figura 4.20 - Efeito da concentração do corante na eficiência de remoção e na quantidade adsorvida ( $n=3$ ).

A concentração inicial de azul-de-metileno fornece informação importante relativamente à força necessária para ultrapassar toda a resistência de transferência de matéria das moléculas entre as fases sólidas e aquosas (Kallel et al., 2016).

A figura 4.20 revela que, utilizando uma dose de adsorvente de  $10 \text{ g.L}^{-1}$ , a eficiência de remoção variou entre 92,7% e 97,8% para uma gama de concentrações entre 10 e  $400 \text{ mg.L}^{-1}$ .



A concentração de resíduo adsorvente foi assim proporcional à concentração do pigmento na solução, o que indica que nesta gama de concentrações não se atingiu de uma forma evidente a saturação do adsorvente.

Uma vez que a concentração de pigmento de 100 mg/L atingiu a maior eficiência de remoção (97,8%) foi esta a concentração escolhida para os seguintes ensaios de adsorção.

Os valores de remoção de azul-de-metileno estão de acordo com o trabalho realizado por Deng e colaboradores (2011). Os autores utilizaram concentrações de azul-de-metileno de 50 e 450 mg.L<sup>-1</sup> e obtiveram eficiências de remoção muito próximas de 100% com adsorvente produzido com haste de algodão tratada com ácido sulfúrico (Deng, Lu, Li, Zhang, & Wang, 2011).

#### 4.5.3. Variação do tempo de contacto

Os resultados dos ensaios de adsorção onde se testou o efeito do tempo de contacto na eficiência de remoção e na capacidade de adsorção são apresentados na figura 4.21. Os mesmos foram realizados com uma dose de 10 g.L<sup>-1</sup>, numa concentração de azul-de-metileno de 100 mg.L<sup>-1</sup>, em agitação “overhead” de 10 rpm.

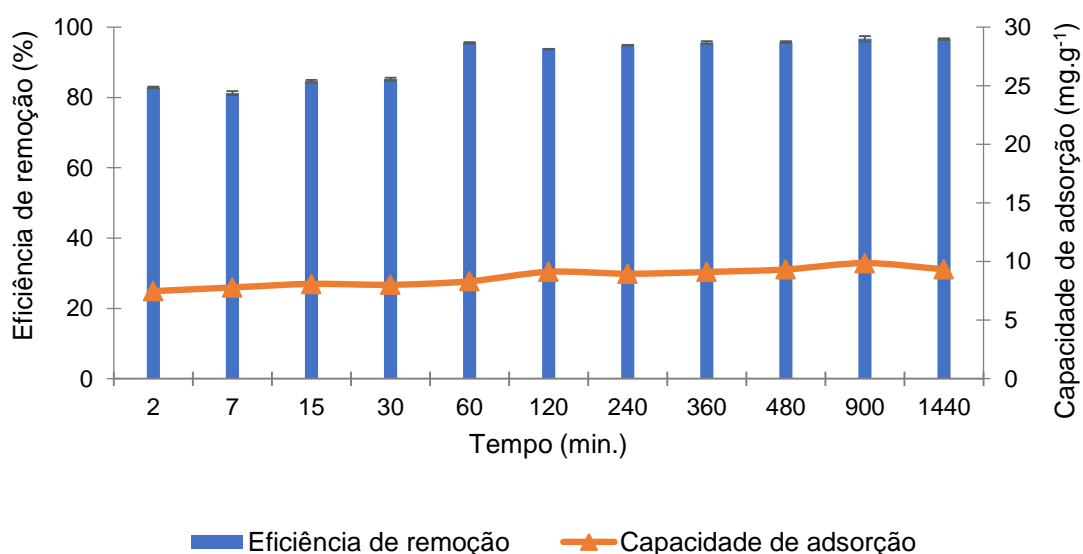


Figura 4.21 - Efeito do tempo de contacto entre o adsorvente e o analito na eficiência de remoção e na quantidade adsorvida (n=3).

A partir da figura 4.21 é possível testemunhar que o ensaio da influência do tempo de contacto na eficiência de adsorção revelou dois regimes de adsorção: para tempos entre 2 min e 30 min a eficiência de remoção oscilou entre 81,3% e 85,2%, enquanto entre 60 min e 1440 min a eficiência de remoção variou entre 93,8% e 96,7%, não se observando uma grande dependência do tempo de contacto em cada um dos intervalos.

Este comportamento sugere a existência de dois fenômenos complementares de adsorção: numa primeira fase, e num curto tempo de contacto, cerca de 85% do pigmento é adsorvido na superfície das partículas do adsorvente, provavelmente através de interações eletrostáticas com grupos polares. Numa segunda fase, cerca de 10% do pigmento é adicionalmente adsorvido. Esta segunda fase de adsorção pode ser devida a um mecanismo complementar e de cinética mais lenta, como a adsorção em poros da biomassa ou na estrutura de algum material polimérico contaminante constituinte desta amostra.

Os resultados da capacidade de adsorção ao longo dos períodos de tempo são semelhantes aos valores apresentados por Cherifi e colaboradores (2013), que testaram uma concentração inicial de  $40 \text{ mg.L}^{-1}$  num resíduo vegetal (Cherifi, Fatiha, & Salah, 2013). No entanto, de acordo com o trabalho de Reddy e co-autores (2015), para uma concentração de azul-de-metileno de  $100 \text{ mg.L}^{-1}$ , num resíduo de espiga de milho, a capacidade de adsorção aumenta acentuadamente até cerca de  $70 \text{ mg.g}^{-1}$  num período de 20 minutos, apresentando depois uma tendência para estabilizar numa concentração de  $80 \text{ mg.g}^{-1}$  (Reddy, Verma, & Subrahmanyam, 2015).

#### 4.5.4. Variação do pH

Os resultados dos ensaios de adsorção onde se testou o efeito da variação do pH são apresentados na figura 4.22. Os mesmos foram realizados com uma dose de  $10 \text{ g.L}^{-1}$ , numa concentração de azul-de-metileno de  $100 \text{ mg.L}^{-1}$ , num tempo de contacto de 1 hora, em agitação “overhead” de 10 rpm.

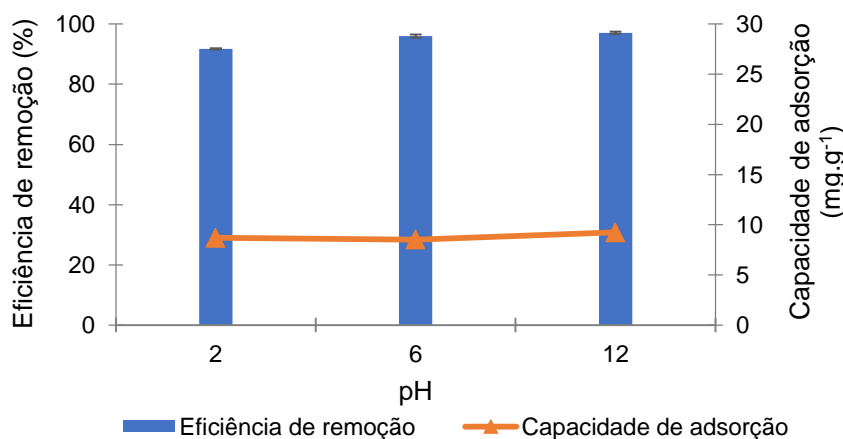


Figura 4.22 - Efeito da variação de pH na eficiência de remoção e na quantidade adsorvida (n=3).

A variação do pH tem um efeito importante na adsorção, visto que o pH do meio irá controlar a magnitude das cargas eletrostáticas que são transmitidas pelas moléculas do corante ionizado. Como resultado, a taxa de adsorção irá variar com o pH do meio (Mahmoud, Salleh, Karim, Idris, & Abidin, 2012).

Pela figura 4.22 é possível verificar que a adsorção do azul-de-metileno ocorreu com eficiências de remoção superiores a 90% para os três valores de pH testados, uma vez que o pigmento catiónico tem afinidade por grupos polares que podem ou não estar desprotonados. A superfície de biomassa lenhocelulósica apresenta numerosos grupos hidroxilo (-OH) e carboxilo (-COOH) (Jia et al., 2017; Dowell & Wang, 2013). A pH=2, estes grupos, estão maioritariamente na forma protonada, no entanto ainda apresentam dipolos negativos importantes nos átomos de oxigénio dos grupos hidroxilo e sobretudo no átomo de oxigénio do grupo carbonilo. Assim sendo, estes grupos podem estabelecer uma ligação dipolo-dipolo com os dipolos positivos do pigmento catiónico.

No entanto, quando o pH sobe até 6, a maior parte dos grupos carboxilo estão desprotonados podendo, portanto, exercer uma maior atração com a carga negativa do carboxilato (-COO<sup>-</sup>). Por fim, a pH=12 mesmo alguns grupos hidroxilo, sobretudo os fenólicos, podem estar desprotonados contribuindo também com cargas negativas para o estabelecimento de ligações fortes com o pigmento catiónico.

O resultado do aumento da eficiência de remoção de azul-de-metileno em consequência do aumento do pH da solução está em concordância com o trabalho de Honorato e colaboradores (2015) que testaram a adsorção de azul-de-metileno com resíduos agroindustriais (Honorato et al., 2015). Também o trabalho de Cherifi e colaboradores (2013) corrobora o aumento de taxa de remoção com o aumento de pH, ao testar a adsorção de azul-de-metileno em carvões activados de fibra vegetal (Cherifi et al., 2013).

#### 4.5.5. Ensaio de dessorção

Este ensaio foi realizado tendo como agente de dessorção uma solução ácida (pH=2) e teve como resultado uma remoção de azul-de-metileno numa concentração média de 30,5 mg.L<sup>-1</sup> (remoção de aproximadamente de 30%, em comparação com a concentração inicial de MB) (figura 4.23).

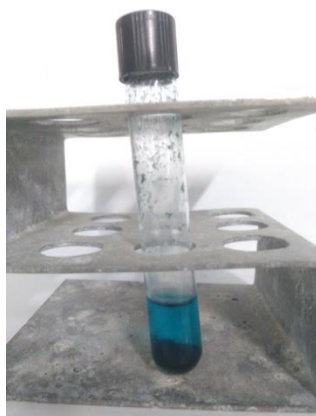


Figura 4.23 - Exemplo de aspeto final da solução ácida após ensaio de dessorção.

A mesma gama de recuperação de azul-de-metileno foi atingida por Shakoore e colaboradores (2016), ao remover azul-de-metileno com uma solução de HCl (Shakoore & Nasar, 2016). Também Kallel e colaboradores (2016) observaram uma recuperação de azul-de-metileno de 35% a pH=2, tendo como adsorvente palha de alho (Kallel et al., 2016).

Uma forma de potenciar a dessorção seria testar um valor de pH mais elevado (ainda dentro da gama ácida) de forma a verificar se efetivamente a adsorção se processa maioritariamente por atrações eletrostáticas.

No entanto, é de referir que o resultado positivo neste teste poderá representar uma vantagem na aplicação deste resíduo enquanto adsorvente de baixo custo, dado que existe potencial para recuperar o pigmento após adsorção. Se forem aplicadas outras condições de pH, num tempo de contacto otimizado, é provável que se consiga uma remoção significativa do analito, de modo a que o adsorvente possa ser regenerado e reutilizado.

## Capítulo 5 - Conclusões e perspectivas futuras

Os três resíduos industriais estudados neste trabalho apresentam composição lenhocelulósica. Dois deles, os resíduos heterogêneos CITRI A e CITRI B, são compostos por vários tipos de materiais (resíduos poliméricos, têxteis, borracha, beatas de cigarro, entre outros) e têm como destino final a deposição em aterros sanitários. O terceiro resíduo, CMC, sendo de composição homogênea (pó de pinho), foi usado como termo de referência. O principal objetivo deste trabalho consistiu na avaliação do potencial dos primeiros dois resíduos para a produção de bioetanol, pretendendo-se assim dar uma solução sustentável a subprodutos que, até agora, nunca tinham sido estudados ou valorizados.

A incorporação destes resíduos heterogêneos em biocombustíveis sólidos apresenta algumas limitações dado o seu elevado teor de cinzas. Assim, dada a sua elevada área superficial sugere-se como viável a sua utilização em processos como a liquefação hidrotérmica ou a decomposição em açúcares para produção de bioetanol.

Dada a sua composição lenhocelulósica, foi avaliado o potencial de produção de bioetanol através destes subprodutos contaminados. Primeiramente, foi realizada uma caracterização das matérias-primas, de modo a determinar se as mesmas seriam indicadas para o referido processo de valorização energética. Esta caracterização permitiu avaliar o teor de holocelulose ( $66,2 \pm 1,9\%$ ,  $63,2 \pm 3,3\%$  e  $58,6 \pm 2,1\%$  para o CMC, CITRI A e CITRI B, respectivamente) e o teor em lenhina Klason ( $27,1 \pm 1,8\%$ ,  $27,1 \pm 3,9\%$  e  $33,8 \pm 0,9\%$  para os mesmos resíduos CMC, CITRI A e CITRI C). Aplicou-se também uma hidrólise quantitativa aos resíduos em estudo para quantificação do seu teor em açúcares totais e redutores, tendo-se obtido concentrações de açúcares totais de  $2012,1 \pm 357,5 \text{ mg.L}^{-1}$ ,  $940,1 \pm 62,9 \text{ mg.L}^{-1}$  e  $1006,4 \pm 89,1 \text{ mg.L}^{-1}$  para os resíduos CMC, CITRI A e CITRI B, respetivamente.

Após a caracterização das amostras, testaram-se diferentes pré-tratamentos (alcalinos, com ácido diluído e hidrotérmico), com o intuito de separar a lenhina dos polissacarídeos e assim aceder à estrutura da celulose. O teor de celulose recuperada no resíduo sólido após os vários ensaios de pré-tratamento com diferentes catalisadores e condições de reação foi avaliado de forma a determinar as condições que maximizam este parâmetro. Assim, o pré-tratamento com concentração de ácido sulfúrico de 1%, temperatura e tempo de operação de  $120^\circ\text{C}$  e 30 minutos permitiu uma recuperação de celulose de  $70,2 \pm 0,2\%$  para o resíduo CMC e de  $57,7 \pm 0,4\%$  para o resíduo CITRI A. Paralelamente, foi também avaliado o teor em compostos fenólicos totais na fração líquida resultante dos pré-tratamentos. Desta determinação obteve-se uma concentração máxima de  $1269,6 \pm 44,2 \text{ mg.L}^{-1}$  e  $963,4 \pm 68,1 \text{ mg.L}^{-1}$  para os resíduos CITRI A e CMC, respetivamente, no pré-tratamento alcalino realizado com hidróxido de potássio aquoso.

Verificou-se que, de uma forma geral, a severidade do tratamento em termos de temperatura ou concentração do catalisador deve ser compensada com um ajuste do tempo de contacto, de

forma a maximizar a solubilização da lenhina, sem provocar uma extensa degradação da celulose e hemicelulose, o que nesta fase de pré-tratamento representa uma diminuição do rendimento global de produção de bioetanol.

Como etapa seguinte aos pré-tratamentos, realizou-se uma hidrólise ácida no intuito que quebrar a estrutura da celulose, originando monossacarídeos, passíveis de serem fermentados. Após isto, foi avaliado um teor de açúcares redutores de  $5913,5 \pm 69,7 \text{ mg.L}^{-1}$ ,  $1821,3 \pm 4,7 \text{ mg.L}^{-1}$  e  $2630,0 \pm 40,3 \text{ mg.L}^{-1}$ , respeitantes aos resíduos CMC, CITRI A e CITRI B.

Tendo em conta o teor em açúcares redutores foi calculado um rendimento teórico de produção de bioetanol, para os resíduos antes e após os pré-tratamentos. Este rendimento foi mais acentuado após a aplicação do pré-tratamento com ácido diluído, o que prova o seu benefício de utilização. Os resíduos pré-tratados apresentaram assim um rendimento teórico em bioetanol de 40,6%, 23,3% e 11,1%, para a amostra CMC, CITRI B e CITRI A.

Além da valorização energética, foram adicionalmente realizados ensaios para avaliação do potencial de adsorção de pigmentos catiónicos (azul-de-metileno) na amostra lenhocelulósica e polimérica CITRI A, de forma a validar uma aplicação da perspectiva de valorização material, para este tipo de resíduos. Os resultados obtidos nestes ensaios demonstraram grande potencial de valorização deste resíduo como adsorvente industrial.

Na sequência deste trabalho sugerem-se várias possibilidades para continuar a explorar estes resíduos:

- Aplicação de novas condições de operação em pré-tratamentos alcalinos, com ácido diluído e água líqüida sobreaquecida, não testadas neste trabalho, no sentido de otimizar as condições de separação da lenhina e recuperação da celulose;
- Valorização da fração líqüida resultante dos pré-tratamentos, a qual apresenta quantidades consideráveis de compostos fenólicos, dos quais alguns apresentam valor comercial;
- No sentido da valorização material, sugerem-se testes de remediação de efluentes reais contaminados com pigmentos catiónicos e de efluentes contendo outros analitos catiónicos como os metais pesados.

## Referências bibliográficas

- Abdul Fattah, S. S., Mohamed, R., Jahim, J. M., Illias, R. M., Abu Bakar, F. D., & Murad, A. M. A. (2016). Commercial cellulases and hemicellulase performance towards oil palm empty fruit bunch (OPEFB) hydrolysis, 20002, 20002. <http://doi.org/10.1063/1.4966712>
- Abengoa. (2011). Áreas de innovación. Disponível em: [http://www.abengoa.com/web/en/innovacion/areas\\_de\\_innovacion/biocombustibles\\_2\\_generacion/](http://www.abengoa.com/web/en/innovacion/areas_de_innovacion/biocombustibles_2_generacion/) (Acedido a 17/julho/2017)
- Achinas, S., & Euverink, G. J. W. (2016). Consolidated briefing of biochemical ethanol production from lignocellulosic biomass. *Eletronic Journal of Biotechnology*, 23, 44–53. <http://doi.org/10.1016/j.ejbt.2016.07.006>
- Adekunle, A., Orsat, V., & Raghavan, V. (2016). Lignocellulosic bioethanol: A review and design conceptualization study of production from cassava peels. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 64, 518–530. <http://doi.org/10.1016/j.rser.2016.06.064>
- Aditiya, H. B., Mahlia, T. M. I., Chong, W. T., Nur, H., & Sebayang, A. H. (2016). Second generation bioethanol production: A critical review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 66, 631–653. <http://doi.org/10.1016/j.rser.2016.07.015>
- Agbor, G. A., Vinson, J. A., & Donnelly, P. E. (2014). International Journal of Food Science, Nutrition and Dietetics (IJFS) ISSN 2326-3350 Folin-Ciocalteu Reagent for Polyphenolic Assay Description of Folin Ciocalteu Reagent, 3, 147–156.
- Agbor, V. B., Cicek, N., Sparling, R., Berlin, A., & Levin, D. B. (2011). Biomass pretreatment: Fundamentals toward application. *Biotechnology Advances*, 29(6), 675–685. <http://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.05.005>
- Agência Portuguesa do Ambiente. (2017a). Licenciamento - Deposição de Resíduos em Aterro. Disponível em: <https://www.apambiente.pt/index.php?ref=16&subref=84&sub2ref=943&sub3ref=945> (Acedido a 13/abril/2017)
- Agência Portuguesa do Ambiente. (2017b). Plano Estratégico dos Resíduos Industriais Disponível em: <https://apambiente.pt/index.php?ref=16&subref=84&sub2ref=108&sub3ref=208> (Acedido a 14/abril/2017)
- Agência Portuguesa do Ambiente. (2017c). Plano Estratégico para os Resíduos Urbanos Disponível em: <https://apambiente.pt/index.php?ref=16&subref=84&sub2ref=108&sub3ref=209> (Acedido a 14/abril/2017)
- Alvira, P., Tomás-Pejó, E., Ballesteros, M., & Negro, M. J. (2010). Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. *Bioresource Technology*, 101(13), 485–486. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.11.093>
- Aro, E. M. (2016). From first generation biofuels to advanced solar biofuels. *Ambio*, 45(1), 24–31. <http://doi.org/10.1007/s13280-015-0730-0>
- Bae, C., & Kim, J. (2016). Alternative fuels for internal combustion engines. *Proceedings of the Combustion Institute*, 0, 1–25. <http://doi.org/10.1016/j.proci.2016.09.009>
- Baird, J. A. C. (1989). The History of Ethanol in America. *Oklahoma Academic Standards*, 76(1), 68. <http://doi.org/10.2307/3400906>
- Balat, M. (2011). Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical

- pathway: A review. *Energy Conversion and Management*, 52(2), 858–875. <http://doi.org/10.1016/j.enconman.2010.08.013>
- Balat, M., Balat, H., & Öz, C. (2008). Progress in bioethanol processing. *Progress in Energy and Combustion Science*, 34(5), 551–573. <http://doi.org/10.1016/j.pecs.2007.11.001>
- Behera, S., Arora, R., Nandhagopal, N., & Kumar, S. (2014). Importance of chemical pretreatment for bioconversion of lignocellulosic biomass. *Renew. Sustain. Energy Rev.*, (36), 91–106. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.04.047>
- Biofuelsdigest. (2010). Biofuelsdigest. Disponível em: <http://www.biofuelsdigest.com/bdigest/2010/10/25/-weyland-debuts-cellulosic-ethanol-pilot-in-norway/> (Acedido a 03/agosto/2017)
- Biogasol. (2017). Biogasol. Disponível em: <http://www.biogasol.com/technology> (Acedido a 05/agosto/2017)
- Bobleter, O. (1994). Hydrothermal degradation of polymers derived from plants. *Prog. Polym. Sci.*, (19), 797 – 841. [https://doi.org/10.1016/0079-6700\(94\)90033-7](https://doi.org/10.1016/0079-6700(94)90033-7)
- Boulton, R., Singleton, V., Bisson, L., & Kunkee, R. (1999). Yeast and biochemistry of ethanol fermentation. In *Principles and Practices of Winemaking* (Vol. 4, pp. 102–192). Springer.
- Bower, S., Wickramasinghe, R., Nagle, N. J., & Schell, D. J. (2008). Modeling sucrose hydrolysis in dilute sulfuric acid solutions at pretreatment conditions for lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, 99(15), 7354–7362. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.05.045>
- Bravo, C., Garcés, D., Faba, L., Sastre, H., & Ordóñez, S. (2017). Selective arabinose extraction from Pinus sp. sawdust by two-step soft acid hydrolysis. *Industrial Crops & Products*, 104(May), 229–236. <http://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.04.027>
- Brodeur, G., Yau, E., Badal, K., Collier, J., Ramachandran, K. B., & Ramakrishnan, S. (2011). Chemical and physicochemical pretreatment of lignocellulosic biomass: a review. *Enzyme Res.*, 2011(787532). <http://doi.org/10.4061/2011/787532>
- Buchanan, M. (2007). Solvent extractives of wood and pulp (Proposed revision of T 204 cm-97).
- Byadgi, S. A., & Kalburgi, P. B. (2016). ScienceDirect Production of Bioethanol from Waste Newspaper. *Procedia Environmental Sciences*, 35, 555–562. <http://doi.org/10.1016/j.proenv.2016.07.040>
- Carvalho F, Duarte LC, G. F. (2008). Hemicellulose biorefineries: a review on biomass pretreatments. *Journal of Scientific and Industrial Research*, 67, 849–864.
- Centi, G., Lanzafame, P., & Perathoner, S. (2011). Analysis of the alternative routes in the catalytic transformation of lignocellulosic materials. *Catalysis Today*, 167(1), 14–30. <http://doi.org/10.1016/j.cattod.2010.10.099>
- Chandra, R. P., Bura, R., Mabee, W. E., Berlin, A., Pan, X., & Saddler, J. N. (2007). Substrate pretreatment: the key to effective enzymatic hydrolysis of lignocellulosics? *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, (108), 67–93. [http://doi.org/10.1007/10\\_2007\\_064](http://doi.org/10.1007/10_2007_064)
- Chapple C, Ladisch M, Meilan R, L. (2007). Loosening lignin's grip on biofuel production. *Nat Biotechnol*, 748(25), 746–748. <http://doi.org/10.1038/nbt0707-746>



- Chaula, Z., Said, M., & John, G. (2014). Thermal Characterization of Pine Sawdust as Energy Source Feedstock, *4*(4), 57–65.
- Chemical new seed. (2015). Applications and uses of benzoic acid. Disponível em <https://www.foodsweeteners.com/applications-and-uses-of-benzoic-acid/> (Acedido a 17/agosto/2017)
- Chen, L., Cheng, C., & Liang, J. (2015). Effect of esterification condensation on the Folin-Ciocalteu method for the quantitative measurement of total phenols. *Food Chemistry*, *170*, 10–15. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.08.038>
- Cherifi, H., Fatiha, B., & Salah, H. (2013). Kinetic studies on the adsorption of methylene blue onto vegetal fiber activated carbons. *Applied Surface Science*, *282*, 52–59. <http://doi.org/10.1016/j.apsusc.2013.05.031>
- Conde-Mejía, C., Jiménez-Gutiérrez, A., & El-Halwagi, M. (2012). A comparison of pretreatment methods for bioethanol production from lignocellulosic materials. *Process Safety and Environmental Protection*, *90*(3), 189–202. <http://doi.org/10.1016/j.psep.2011.08.004>
- Correia, R. (2015). *Torrefação de biomassa de Arundo donax L. e de Phoenix canariensis com vista à sua valorização energética ou material.*
- Conselho da União Europeia. (1999). Directiva 1999/31/CE. *Jornal Oficial Das Comunidades Europeias*, *182*(10), 1–19.
- Cotana, F., Cavalaglio, G., Gelosia, M., Nicolini, A., Coccia, V., & Petrozzi, A. (2014). Production of bioethanol in a second generation prototype from pine wood chips. *Energy Procedia*, *45*, 42–51. <http://doi.org/10.1016/j.egypro.2014.01.006>
- Cozzanij, V., Nicoletta, C., Petarcaj, L., Rovatti, M., & Togno, L. (2006). A Fundamental Study on Conventional Pyrolysis of a Refuse-Derived Fuel, (1992), 2006–2020. <http://doi.org/10.1021/ie00045a010>
- Crini, G., 2006. Non-conventional low-cost adsorbents for dye removal: A review. *Bioresource Technology*, *97*(9), pp.1061–1085.
- Da Silva, A. R. G., Torres Ortega, C. E., & Rong, B. G. (2016). Techno-economic analysis of different pretreatment processes for lignocellulosic-based bioethanol production. *Bioresource Technology*, *218*, 561–570. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.07.007>
- Dasari, R. K., & Berson, E. R. (2007). The effect of particle size on hydrolysis reaction rates and rheological properties in cellulosic slurries. *Applied Biochemistry And Biotechnology*, *136–140*. <http://doi.org/10.1007/s12010-007-9059-x>
- Demirbas, A. (2008). Biofuels sources, biofuel policy, biofuel economy and global biofuel projections. *Energy Conversion and Management*, *49*(8), 2106–2116. <http://doi.org/10.1016/j.enconman.2008.02.020>
- Demirbas, A. (2008). The Importance of Bioethanol and Biodiesel from Biomass. *Energy Sources, Part B: Economics, Planning, and Policy*, *3*(2), 177–185. <http://doi.org/10.1080/15567240600815117>
- Demirbas, A. (2009). Political, economic and environmental impacts of biofuels: A review. *Applied Energy*, *86* (SUPPL. 1), S108–S117. <http://doi.org/10.1016/j.apenergy.2009.04.036>

- Demirbas, A., & Fatih Demirbas, M. (2011). Importance of algae oil as a source of biodiesel. *Energy Conversion and Management*, 52(1), 163–170. <http://doi.org/10.1016/j.enconman.2010.06.055>
- Demirbas, M. F. (2011). Biofuels from algae for sustainable development. *Applied Energy*, 88(10), 3473–3480. <http://doi.org/10.1016/j.apenergy.2011.01.059>
- Dence, C. W. (1992). The determination of lignin. In: Lin, S.Y., Dence, C.W. (Eds.), *Methods in Lignin Chemistry*. In *Springer, Berlin* (pp. 33–61).
- Deng, H., Lu, J., Li, G., Zhang, G., & Wang, X. (2011). Adsorption of methylene blue on adsorbent materials produced from cotton stalk. *Chemical Engineering Journal*, 172(1), 326–334. <http://doi.org/10.1016/j.cej.2011.06.013>
- Diário da República n.º 252/2014, 2.º Suplemento, Série I, de 31/12, Páginas 320-338
- Dong energy. (2016). Bioenergy Thermal Power. Disponível em: <http://www.dongenergy.com/en/our-business/bioenergy-thermal-power> (Acedido a 07/06/2017)
- Dowell, F. & Wang, D., 2013. Qualitative and quantitative analysis of lignocellulosic biomass using infrared techniques : A mini-review.
- Dragone, G., Fernandes, B., Vicente, A., & Teixeira, J. (2010). Third generation biofuels from microalgae. *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*, 1355–1366. <https://doi.org/10.1016/j.proeng.2015.05.068>
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., & Smith, F. (1956). Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Analytical Chemistry*, 28(3), 350–356. <https://doi.org/10.1021/ac60111a017>
- Eisentraut, A. (2010). Sustainable Production of Second- generation Biofuels -. *Renewable Energy*, 1–39. <http://doi.org/10.1787/9789264084247-en>
- Escobar, J. C., Lora, E. S., Venturini, O. J., Yáñez, E. E., Castillo, E. F., & Almazan, O. (2009). Biofuels: Environment, technology and food security. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 13(6–7), 1275–1287. <http://doi.org/10.1016/j.rser.2008.08.014>
- Esteghlalian, A., Hashimoto, A. G., Fenske, J. J., & Penner, M. H. (1997). Modeling and optimization of the dilute-sulfuric-acid pretreatment of corn stover, poplar and switchgrass. *Bioresource Technology*, 59(2–3), 129–136. [http://doi.org/10.1016/S0960-8524\(97\)81606-9](http://doi.org/10.1016/S0960-8524(97)81606-9)
- Ethanol Producer Magazine. (2017). Plant List. Disponível em: <http://www.ethanolproducer.com/plants/listplants> (Acedido a 01/setembro/2017)
- ETIP Bioenergy. (2017). Biofuels Markets. Disponível em: <http://www.etipbioenergy.eu/markets-policies/biofuels-markets> (Acedido a 02/setembro/2017)
- Eurostat. (2015). *Sustainable development in the European Union*. <http://doi.org/10.2785/999711>
- Eurostat. (2017). Eurostat. Disponível em [appsso.eurostat.ec.europa.eu/nui/show.do?dataset=ENV\\_WASTRT&long=en](https://appsso.eurostat.ec.europa.eu/nui/show.do?dataset=ENV_WASTRT&long=en) (Acedido a 01/julho/2017)

- F., F., & Shastri, Y. (2016). Optimal control of enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass. *Resource-Efficient Technologies*, 2, S96–S104. <http://doi.org/10.1016/j.reffit.2016.11.006>
- Fatih Demirbas, M., Balat, M., & Balat, H. (2011). Biowastes-to-biofuels. *Energy Conversion and Management*, 52(4), 1815–1828. <http://doi.org/10.1016/j.enconman.2010.10.041>
- Folin, O., & Boston, M. (1912). Phenols. Disponível em <http://www.jbc.org/> (Acedido a 26/agosto/2017)
- Gallardo, A., Carlos, M., Bovea, M. D., Colomer, F. J., & Albarrán, F. (2014). Analysis of refuse- derived fuel from the municipal solid waste reject fraction and its compliance with quality standards. *Journal of Cleaner Production*, 83, 118–125. <http://doi.org/10.1016/j.jclepro.2014.07.085>
- Gao, Y., Xu, J., Zhang, Y., Yu, Q., Yuan, Z., & Liu, Y. (2013). Bioresource Technology Effects of different pretreatment methods on chemical composition of sugarcane bagasse and enzymatic hydrolysis. *Bioresource Technology*, 144, 396–400. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.06.036>
- García, R., Pizarro, C., Lavín, A. G., & Bueno, J. L. (2012). Characterization of Spanish biomass wastes for energy use. *Bioresource Technology*, 103(1), 249–58. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.10.004>
- Gentil, L.V. & Vale, A.T., (2015). energy balance and efficiency in wood sawdust. , pp.281–288.
- Gírio, F. M., Fonseca, C., Carvalheiro, F., Duarte, L. C., Marques, S., & Bogel-Lukasik, R. (2010). Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. *Bioresource Technology*, 101(13), 4775–4800. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.01.088>
- Gong, C., Huang, J., Feng, C., Wang, G., Tabil, L., & Wang, D. (2016). Effects and mechanism of ball milling on torrefaction of pine sawdust. *Bioresource Technology*, 214, 242–247. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.04.062>
- Gossett, J. M., Stuckey, D. C., Owen, W. F., & Mccarty, P. L. (1982). Heat treatment and anaerobic digestion of refuse. *J. Environ. Eng. Div.*, 108, 437–454.
- Grammelis, P., Basinas, P., Malliopoulou, a., & Sakellariopoulos, G. (2009). Pyrolysis kinetics and combustion characteristics of waste recovered fuels. *Fuel*, 88(1), 195–205. <http://doi.org/10.1016/j.fuel.2008.02.002>
- Gregg, D., & Saddler, J. N. (1996). A techno-economic assessment of the pretreatment and fractionation steps of a biomass-to-ethanol process. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 711–727. <http://doi.org/10.1007/BF02941753>
- Gris, L. R. S., Trierweiler, J. O., & Farenzena, M. (2011). Produção da Microalga *Nannochloropsis oculata* em Fotobiorreator Airlift, 129.
- Guo, G. L., Chen, W. H., Chen, W. H., Men, L. C., & Hwang, W. S. (2008). Characterization of dilute acid pretreatment of silvergrass for ethanol production. *Bioresource Technology*, 99(14), 6046–6053. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.12.047>
- Guo, M., Song, W., & Buhain, J. (2015). Bioenergy and biofuels: History, status, and perspective. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 42, 712–725. <http://doi.org/10.1016/j.rser.2014.10.013>
- Gupta, A., Das, S. P., Ghosh, A., Choudhary, R., Das, D., & Goyal, A. (2014). Bioethanol

- production from hemicellulose rich *Populus nigra* involving recombinant hemicellulases from *Clostridium thermocellum*. *Bioresource Technology*, 165(C), 205–213.  
<http://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.03.132>
- Gupta, A., & Verma, J. P. (2015). Sustainable bio-ethanol production from agro-residues: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 41, 550–567.  
<http://doi.org/10.1016/j.rser.2014.08.032>
- Gupta, V.K. & Suhas, (2009). Application of low-cost adsorbents for dye removal - A review. *Journal of Environmental Management*, 90(8), pp.2313–2342.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jenvman.2008.11.017>
- Haghighi Mood, S., Hossein Golfeshan, A., Tabatabaei, M., Salehi Jouzani, G., Najafi, G. H., Gholami, M., & Ardjmand, M. (2013). Lignocellulosic biomass to bioethanol, a comprehensive review with a focus on pretreatment. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 27, 77–93. <http://doi.org/10.1016/j.rser.2013.06.033>
- Harmsen, P., & Huijgen, W. (2010). Literature Review of Physical and Chemical Pretreatment Processes for Lignocellulosic Biomass.
- Hashemian, S., Ardakani, M. K., & Salehifar, H. (2013). Kinetics and Thermodynamics of Adsorption Methylene Blue onto Tea Waste/CuFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> Composite, 1–7.  
<http://dx.doi.org/10.4236/ajac.2013.47A001>
- Haykırı-açma, H., & Yaman, S. (2016). Kinetic modelling of RDF pyrolysis : Model-fitting and model-free approaches, 48, 275–284. <http://doi.org/10.1016/j.wasman.2015.11.027>
- Hendriks, A. T. W. M., & Zeeman, G. (2009). Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, 100(1), 10–18.  
<http://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.05.027>
- Hernández, E., García, A., López, M., Puls, J., Parajó, J. C., & Martín, C. (2013). Dilute sulphuric acid pretreatment and enzymatic hydrolysis of *Moringa oleifera* empty pods. *Industrial Crops and Products*, 44, 227–231. <http://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.11.001>
- Hinman, N. D., Schell, D. J., Riley, C. J., Bergeron, P. W., & Walter, P. J. (1992). Preliminary estimate of the cost of ethanol production for SSF technology. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, (34/35), 639–649.
- Hongdan, Z., Shaohua, X., & Shubin, W. (2013). Bioresource Technology Enhancement of enzymatic saccharification of sugarcane bagasse by liquid hot water pretreatment. *Bioresource Technology*, 143, 391–396. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.05.103>
- Honorato, A. C., Machado, J. M., Celante, G., Borges, W. G. P., Dragunski, D. C., & Caetano, J. (2015). Biossorção de azul-de-metileno utilizando resíduos agroindustriais. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola E Ambiental*, 19(7), 705–710.  
<http://dx.doi.org/10.1590/1807-1929/agriambi.v19n7p705-710>
- Hsu, T.C., Guo, G.L., Chen, W.H., & Hwang, W.S. (2010). Effect of dilute acid pretreatment of rice straw on structural properties and enzymatic hydrolysis. *Bioresource Technology*, 101(13), 4907–4913. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.10.009>
- Hu, F., & Ragauskas, A. (2012). Pretreatment and Lignocellulosic Chemistry. *Bioenergy Research*, 5(4), 1043–1066. <http://doi.org/10.1007/s12155-012-9208-0>

- Hu, Z., & Wen, Z. (2008). Enhancing enzymatic digestibility of switchgrass by microwave-assisted alkali pretreatment. *Biochemical Engineering Journal*, 38, 369–378. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2007.08.001>
- IEA. (2008). *Energy technology perspective. Scenario and strategies to 2050. Strategies*. <http://doi.org/10.1787/9789264041431-en>
- Imman, S., Arnthong, J., Burapatana, V., & Champreda, V. (2014). Bioresource Technology Effects of acid and alkali promoters on compressed liquid hot water pretreatment of rice straw. *Bioresource Technology*, 171, 29–36. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.08.022>
- Inbicon. (2017). Biomass Refinery. Disponível em: <http://www.inbicon.com/en/biomass-refinery> (Acedido a 02/setembro/2017)
- Irfan, M., Nadeem, M., Syed, Q., & Qazi, J. I. (2016). Statistical otimization of dilute acid pretreatment of pinus needles to be used as substrate for biofuel production. *Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization and Environmental Effects*, 38(14), 1983–1992. <http://doi.org/10.1080/15567036.2015.1037973>
- Isabel, A. (2014). Isolamento de Xilanas por Precipitação com Antisolventes Engenharia Química
- Jia, Z., Li, Z., Ni, T., & Li, S. (2017). Adsorption of low-cost absorption materials based on biomass (Cortaderia selloana flower spikes) for dye removal: Kinetics, isotherms and thermodynamic studies. *Journal of Molecular Liquids*, 229, 285–292. <http://doi.org/10.1016/j.molliq.2016.12.059>
- Jiang, D., Ge, X., Zhang, Q., & Li, Y. (2016). Comparison of liquid hot water and alkaline pretreatments of giant reed for improved enzymatic digestibility and biogas energy production. *Bioresource Technology*, 216, 60–68. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.05.052>
- Jin, S., Zhang, G., Zhang, P., Li, F., Fan, S., & Li, J. (2016). Thermo-chemical pretreatment and enzymatic hydrolysis for enhancing saccharification of catalpa sawdust. *Bioresource Technology*, 205, 34–39. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.01.019>
- Jonglertjunya, W., Makkhanon, W., Siwanta, T., & Prayoonyong, P. (2014). Dilute acid hydrolysis of sugarcane bagasse for butanol fermentation. *Chiang Mai Journal of Science*, 41(1), 60–70. <http://doi.org/10.3303/CET1543105>
- Jönsson, L. J., & Martín, C. (2016). Pretreatment of lignocellulose: Formation of inhibitory by-products and strategies for minimizing their effects. *Bioresource Technology*, 199, 103–112. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.10.009>
- Kallel, F., Chaari, F., Bouaziz, F., Bettaieb, F., Ghorbel, R., & Chaabouni, S. E. (2016). Sorption and desorption characteristics for the removal of a toxic dye, methylene blue from aqueous solution by a low cost agricultural by-product. *Journal of Molecular Liquids*, 219, 279–288. <http://doi.org/10.1016/j.molliq.2016.03.024>
- Kang, K. E., Park, D.H., & Jeong, G.T. (2013). Effects of inorganic salts on pretreatment of Miscanthus straw. *Bioresource Technology*, (132), 160–165. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.01.012>
- Karadirek, Ş., Kanmaz, N., Balta, Z., Demirçivi, P., & Jülide, H. (2016). Talanta Determination of total antioxidant capacity of humic acids using CUPRAC , Folin – Ciocalteu , noble

- metal nanoparticle- and solid – liquid extraction-based methods, 153, 120–129. <http://doi.org/10.1016/j.talanta.2016.03.006>
- Karimi, K., Kheradmandinia, S., & Taherzadeh, M. J. (2006). Conversion of rice straw to sugars by dilute-acid hydrolysis. *Biomass and Bioenergy*, 30(3), 247–253. <http://doi.org/10.1016/j.biombioe.2005.11.015>
- Karimi, K., & Taherzadeh, M. J. (2016). Bioresource Technology A critical review of analytical methods in pretreatment of lignocelluloses : Composition , imaging , and crystallinity. *Bioresource Technology*, 200, 1008–1018. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.11.022>
- Kim, S., & Dale, B. (2004). Global potential bioethanol production fromwasted crops and crop residues. *Biomass Bioenergy*, (26), 361–375. [http://doi.org/10.1016/S01406-701\(04\)807379](http://doi.org/10.1016/S01406-701(04)807379)
- Koçar, G., & Civaş, N. (2013). An overview of biofuels from energy crops: Current status and future prospects. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 28, 900–916. <http://doi.org/10.1016/j.rser.2013.08.022>
- Koizumi, T. (2015). Biofuels and food security. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 52, 829–841. <http://doi.org/10.1016/j.rser.2015.06.041>
- Kruse, A., & Dinjus, E. (2007). Hot compressed water as reaction medium and reactant properties and synthesis reactions. *J. Supercrit. Fluids*, (39), 363–380. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2006.03.016>
- Kuhad, R. C., Gupta, R., Khasa, Y. P., & Singh, A. (2010). Bioethanol production from Lantana camara (red sage): Pretreatment, saccharification and fermentation. *Bioresource Technology*, 101(21), 8348–8354. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.043>
- Kulp, J. (1990). Acid Rain: Causes, effects, and control. *Regulation*, 13(1), 41–50.
- Kumar, A. K., & Sharma, S. (2017). Recent updates on different methods of pretreatment of lignocellulosic feedstocks: a review. *Bioresources and Bioprocessing*, 4(1), 7. <http://doi.org/10.1186/s40643-017-0137-9>
- Kumar, P., Barrett, D. M., Delwiche, M. J., & Stroeve, P. (2009). Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 48(8), 3713–3729. <http://doi.org/10.1021/ie801542g>
- Kunz, T., Lee, E. J., Schiwek, V., Seewald, T., & Methner, F. J. (2011). Glucose - A reducing sugar? Reducing properties of sugars in beverages and food. *BrewingScience*, 64(7–8), 61– 67.
- Larsson, S., Palmqvist, E., Hahn-Hägerdal, B., Tengborg, C., Stenberg, K., Zacchi, G., & Nilvebrant, N. O. (1999). The generation of fermentation inhibitors during dilute acid hydrolysis of softwood. *Enzyme and Microbial Technology*, 24(3–4), 151–159. [http://doi.org/10.1016/S0141-0229\(98\)00101-X](http://doi.org/10.1016/S0141-0229(98)00101-X)
- Lawther, J. M., & Sun, R. C. (1996). The fractional characterisation of polysaccharides and lignin components in alkaline treated and atmospheric refined wheat straw. *Ind. Crops Prod.*, 5, 87–95. [https://doi.org/10.1016/0926-6690\(96\)00002-7](https://doi.org/10.1016/0926-6690(96)00002-7)
- Lesaffre. (2017). Bioethanol - Green Chemistry. Disponível em: <http://www.lesaffre.com-activities/biotechnologies/bioethanol-green-chemistry/> (Acedido a 02/setembro/2017)

- Li, H., Jiang, W., Jia, J., & Xu, J. (2014). Bioresource Technology pH pre-corrected liquid hot water pretreatment on corn stover with high hemicellulose recovery and low inhibitors formation. *Bioresource Technology*, 153, 292–299. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.11.089>
- Ling, Y., Zhao, X., Li, X., Wang, X., Yang, Y., Wang, Z., ... Zhang, Y. (2015). Novel FTS-diamine/cinnamic acid hybrids inhibit tumor cell proliferation and migration and promote apoptosis via blocking Ras-related signaling in vitro. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 75(2), 381–392. <http://doi.org/10.1007/s00280-014-2650-2>
- Liu, C., & Wyman, C. E. (2003). The effect of flow rate of compressed hot water on xylan, lignin and total mass removal from corn stover. *Ind. Eng. Chem. Res.*, (42), 5409–5416. <http://doi.org/10.1021/ie030458k>
- Liu, J., Li, R., Shuai, L., You, J., Zhao, Y., Chen, L., ... Chen, L. (2017). Industrial Crops & Products Comparison of liquid hot water (LHW) and high boiling alcohol / water (HBAW) pretreatments for improving enzymatic saccharification of cellulose in bamboo. *Industrial Crops & Products*, 107(May), 139–148. <http://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.05.035>
- Lü, H., Shi, X., Li, Y., Meng, F., Liu, S., & Yan, L. (2017). Chinese Journal of Chemical Engineering Multi-objective regulation in autohydrolysis process of corn stover by liquid hot water pretreatment. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 25(4), 499–506. <http://doi.org/10.1016/j.cjche.2017.01.007>
- Luc, P. (1999). *Organic Chemistry: Structure and Function*. By K. Peter C. Vollhardt. *Molecules* (Vol. 4). <http://doi.org/10.3390/41000316>
- Luo, X., Gleisner, R., Tian, S., Negron, J., Zhu, W., Horn, E., Normal, C. (2010). Evaluation of Mountain Beetle-Infested Lodgepole Pine for Cellulosic Ethanol Production by Sulfite Pretreatment to Overcome Recalcitrance of Lignocellulose, 8258–8266. <http://doi.org/10.1021/ie1003202>
- Lynd, L. R., Weimer, P. J., Zyl, W. H. van, & Pretorius, I. S. (2002). Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. *Bioresource Technology*, 66(3), 506–577. <http://doi.org/10.1128/MMBR.66.3.506>
- Lyu, H., Lv, C., Zhang, M., Liu, J., Meng, F., & Geng, Z. F. (2017). Bioresource Technology Kinetic studies of the strengthening effect on liquid hot water pretreatments by organic acids. *Bioresource Technology*, 235, 193–201. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.03.115>
- Mahmoud, D. K., Salleh, M. A. M., Karim, W. A. W. A., Idris, A., & Abidin, Z. Z. (2012). Batch adsorption of basic dye using acid treated kenaf fibre char: Equilibrium, kinetic and thermodynamic studies. *Chemical Engineering Journal*, 181–182, 449–457. <http://doi.org/10.1016/j.cej.2011.11.116>
- Mansouri, A., Rihani, R., Laoufi, A. N., & Özkan, M. (2016). Production of bioethanol from a mixture of agricultural feedstocks: Biofuels characterization. *Fuel*, 185, 612–621. <http://doi.org/10.1016/j.fuel.2016.08.008>
- Marković, S., Stanković, A., Lopičić, Z., Lazarević, S., Stojanović, M., & Uskoković, D. (2015). Application of raw peach shell particles for removal of methylene blue. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 3(2), 716–724. <http://doi.org/10.1016/j.jece.2015.04.002>

- Materazzi, M., Lettieri, P., Mazzei, L., Taylor, R., & Chapman, C. (2015). Fate and behavior of inorganic constituents of RDF in a two stage fluid bed-plasma gasification plant. *Fuel*, 150, 473–485. <http://doi.org/10.1016/j.fuel.2015.02.059>
- Md. Fakruddin, Md. Abdul Quayum, Monzur Morshed Ahmed and Naiyyum Choudhury, 2012. Analysis of Key Factors Affecting Ethanol Production by *Saccharomyces cerevisiae* IFST-072011. *Biotechnology*, 11: 248-252. <http://doi.org/10.3923/biotech.2012.248.252>
- Menon, V., & Rao, M. (2012). Trends in bioconversion of lignocellulose: Biofuels, platform chemicals & biorefinery concept. *Progress in Energy and Combustion Science*, 38(4), 522– 550. <http://doi.org/10.1016/j.pecs.2012.02.002>
- Michelin, M., & Teixeira, J. A. (2016). Liquid hot water pretreatment of multi feedstocks and enzymatic hydrolysis of solids obtained thereof. *Bioresource Technology*, 216, 862–869. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.06.018>
- Miller, G. (1959). Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar, (III). <http://doi.org/10.1021/ac60147a030>
- Ministério da Economia da Inovação e do Desenvolvimento. (2015). Decreto-Lei n.º 141/2010 de 31 de dezembro. *Diário Da República 1ª Série*, 253, 6093–6098.
- Ministério da Economia e da Inovação. (2006a). Decreto-Lei nº 62/2006 de 21 de março, *Diário Da República 1ª Série*, 57, 250-253.
- Ministério da Economia e da Inovação. (2006b). Decreto-Lei nº 66/2006 de 22 de março, *Diário Da República 1ª Série*, 58, 2079–2081.
- Ministério do Ambiente do Ordenamento do Território e do Desenvolvimento Regional. (2009). Decreto lei n.º 183/2009 de 10 de agosto. *Diário Da República 1ª Série*, 153, 5170–5198.
- Mitchell, V. D., Taylor, C. M., & Bauer, S. (2014). Comprehensive Analysis of Monomeric Phenolics in Dilute Acid Plant Hydrolysates. *Bioenergy Research*, 7(2), 654–669. <http://doi.org/10.1007/s12155-013-9392-6>
- Mohammed, A. et al., (2012). A Comparative Analysis and Characterization of Animal Bones as Adsorbent. , 3(5), pp.3089–3096.
- Mohammed, M. A., Shitu, A., & Ibrahim, A. (2014). Removal of Methylene Blue Using Low Cost Adsorbent : A Review, 4(1), 91–102.
- Montenegro, M., (2006). The numbers behind ethanol, cellulosic ethanol, and biodiesel in the U.S. , p.1. Disponível em: <http://grist.org/article/montenegro/> (Acedido a 16/agosto/2017)
- Mohd Azhar, S. H., Abdulla, R., Jambo, S. A., Marbawi, H., Gansau, J. A., Mohd Faik, A. A., & Rodrigues, K. F. (2017). Yeasts in sustainable bioethanol production: A review. *Biochemistry and Biophysics Reports*, 10(February), 52–61. <http://doi.org/10.1016/j.bbrep.2017.03.003>
- Moncada, J., Cardona, C. A., Higueta, J. C., Vélez, J. J., & López-Suarez, F. E. (2016). Wood residue (*Pinus patula* bark) as an alternative feedstock for producing ethanol and furfural in Colombia: Experimental, techno-economic and environmental assessments. *Chemical Engineering Science*, 140, 309–318. <http://doi.org/10.1016/j.ces.2015.10.027>
- Montané, D., Abelló, S., Farriol, X., & Berrueco, C. (2013). Volatilization characteristics of solid



- recovered fuels (SRFs). *Fuel Processing Technology*, 113, 90–96. <https://doi.org/10.1016/j.fuproc.2013.03.026>
- Moreira, M. T., Feijoo, G., & Gonza, S. (2010). Comparative environmental performance of lignocellulosic ethanol from different feedstocks, 14, 2077–2085. <http://doi.org/10.1016/j.rser.2010.03.035>
- Mosier, N., Hendrickson, R., Ho, N., Sedlak, M., & Ladisch, M. R. (2005). Otimization of pH controlled liquid hot water pretreatment of corn stover, 96, 1986–1993. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2005.01.013>
- Mosier, N., Ladisch, C., & Ladisch, M. (2002). Characterization of acid catalytic domains for cellulose hydrolysis and glucose degradation. *Biotechnol Bioeng*, (79), 610–618. <http://doi.org/10.1002/bit.10316>
- Mosier, N., Wyman, C., Dale, B., Elander, R., Lee, Y. Y., Holtzapple, M., & Ladisch, M. (2005). Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, 96(6), 673–686. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2004.06.025>
- Mossi Ghisolfi Group. (2017). Disponível em: <http://www.gruppomg.com/en/business/beta-renewables> (Acedido a 04/setembro/2017)
- Mupondwa, E., Li, X., Tabil, L., Sokhansanj, S., & Adapa, P. (2017). Status of Canada's lignocellulosic ethanol: Part II: Hydrolysis and fermentation technologies. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 79(November 2016), 1535–1555. <http://doi.org/10.1016/j.rser.2016.11.037>
- Naik, S. N., Goud, V. V., Rout, P. K., & Dalai, A. K. (2010). Production of first and second generation biofuels: A comprehensive review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14(2), 578–597. <http://doi.org/10.1016/j.rser.2009.10.003>
- Njoku, S., Iversen, J., Uellendahl, H., & Ahring, B. (2013). Production of ethanol from hemicellulose fraction of cocksfoot grass using pichia stipitis. *Sustainable Chemical Processes*, 1(1), 13. <http://doi.org/10.1186/2043-7129-1-13>
- Nobre, C., Gonçalves, M., Resende, D., Vilarinho, C., Mendes, B. (2016). Removal of chromium and aluminum from aqueous solutions using refuse derived char. *Technological Innovation for Cyber-Physical Systems*, 515-522. <http://doi.org/10.1007/978-3-319-31165-4>
- Noé Arroyo-López, F. Orlić, S., Querol, A., Barrio, E. (2009) Effects of temperature, pH and sugar concentration on the growth parameters of *Saccharomyces cerevisiae*, *S. kudriavzevii* and their interspecific hybrid. *International Journal of Food Microbiology*, 131, 120–127. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.01.035>
- OECD/FAO. (2015). Biofuels. *Agricultural Outlook*, 144. [http://doi.org/10.1787/agr\\_outlook-2015-13-en](http://doi.org/10.1787/agr_outlook-2015-13-en)
- OECD/IEA. (2010). Second-generation biofuels: potential and perspectives. *International Energy Agency*, 1–10.
- Oliva, J. M., Sáez, F., Ballesteros, I., González, A., Negro, M. J., Manzanares, P., & Ballesteros, M. (2003). Effect of lignocellulosic degradation compounds from steam explosion pretreatment on ethanol fermentation by thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus*. *Applied Biochemistry And Biotechnology*, 105, 141–154.

- Ozcan, A., Omeroğlu, C., Erdoğan, Y., & Ozcan, A. S. (2007). Modification of bentonite with a cationic surfactant: An adsorption study of textile dye Reactive Blue 19. *Journal of Hazardous Materials*, 140(1–2), 173–179. <http://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2006.06.138>
- Pacini, H. (2015). *The Development of Bioethanol Markets under Sustainability Requirements*.
- Park, N., Kim, H.-Y., Koo, B.-W., Yeo, H., & Choi, I.-G. (2010). Organosolv pretreatment with various catalysts for enhancing enzymatic hydrolysis of pitch pine (*Pinus rigida*). *Bioresour Technol*, (101), 7046–7053. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.04.020>
- Parlamento Europeu e do Conselho. (2003). Diretiva 2003/30/CE de 8 de maio de 2003. *Jornal Oficial Da União Europeia*, 123, 42–46.
- Parlamento Europeu e do Conselho. (2008). Diretiva 2008/98/CE de 19 de novembro de 2008. *Jornal Oficial Da União Europeia*, 312, 3–30.
- Parlamento Europeu e do Conselho. (2009). Diretiva 2009/28/CE de 23 de abril de 2009. *Jornal Oficial Da União Europeia*, 140, 16–62.
- Parlamento Europeu e do Conselho. (2015). Directiva 2015/1513 de 9 de setembro de 2015. *Jornal Oficial Da União Europeia*, 2015(8), 48–53.
- Pasha, C., Nagavalli, M., & Rao, L. V. (2007). Lantana camara for fuel ethanol production using thermotolerant yeast, 44(Taherzadeh 1999), 666–672. <http://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2007.02116.x>
- Paulová, L., Melzoch, K., Rychtera, M., & Patáková, P. (2013). Production of 2nd generation of liquid biofuels. *Open Access Publisher*. <http://doi.org/10.5772/53492>
- Pedro, N. (2013). *Avaliação do potencial de produção de etanol de 2ª geração a partir dos resíduos das podas do olival*.
- Pellera, F., & Gidarakos, E. (2017). Chemical pretreatment of lignocellulosic agroindustrial waste for methane production. *Waste Management*. <http://doi.org/10.1016/j.wasman.2017.04.038>
- Pettersen, R. (1984). The chemical composition of wood. *The Chemistry of Solid Wood*, 1–9. <http://doi.org/10.1021/ba-1984-0207>
- Pettersen, R. C. (1984). The chemical composition of wood (chapter 2). *American Chemical Society*, 207(chapter 2), 1984. <http://doi.org/10.1021/ba-1984-0207.ch005>
- Qarah, N. A. S., Basavaiah, K., & Abdulrahman, S. A. M. (2017). Spectrophotometric determination of ethionamide in pharmaceuticals using Folin – Ciocalteu reagent and iron (III) -ferricyanide as chromogenic agents. *Integrative Medicine Research*, 11(5), 718–728. <http://doi.org/10.1016/j.jtusci.2016.07.002>
- Qi, W., Zhuang, X., Zhang, Y., Wang, Q., Yu, Q., & Yuan, Z. (2015). Effect of Particle Microstructure on Sulfuric Acid Distribution During Biomass Hydrolysis. *Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization, and Environmental Effects*, 37(23), 2524–2534. <http://doi.org/10.1080/15567036.2012.688089>
- Rabemanolontsoa, H., & Saka, S. (2016). Various pretreatments of lignocellulosics. *Bioresource Technology*, 199, 83–91. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.08.029>
- Rastogi, M., & Shrivastava, S. (2017). Recent advances in second generation bioethanol

- production : An insight to pretreatment , saccharification and fermentation processes. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 80(May), 330–340. <http://doi.org/10.1016/j.rser.2017.05.225>
- Reddy, P. M. K., Verma, P., & Subrahmanyam, C. (2015). Bio-waste derived adsorbent material for methylene blue adsorption. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 58, 500–508. <http://doi.org/10.1016/j.jtice.2015.07.006>
- Robinson, T., Bronson, B., Gogolek, P., & Mehrani, P. (2016). Sample preparation for thermo-gravimetric determination and thermo-gravimetric characterization of refuse derived fuel. *Waste Management*, 48, 265–274. <http://doi.org/10.1016/j.wasman.2015.11.018>
- Rotheut, M., & Quicker, P. (2017). Energetic utilisation of refuse derived fuels from landfill mining. *Waste Management*, 62, 101–117. <http://doi.org/10.1016/j.wasman.2017.02.002>
- Safari, A., Karimi, K., & Shafiei, M. (2017). Bioresource Technology Dilute alkali pretreatment of softwood pine : A biorefinery approach. *Bioresource Technology*, 234, 67–76. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.03.030>
- Saha, B. C., Iten, L. B., Cotta, M. A., & Wu, Y. V. (2005). Dilute acid pretreatment, enzymatic saccharification and fermentation of wheat straw to ethanol. *Process Biochemistry*, 40(12), 3693–3700. <http://doi.org/10.1016/j.procbio.2005.04.006>
- Salleh, M. A. M., Mahmoud, D. K., Karim, W. A. W. A., & Idris, A. (2011). Cationic and anionic dye adsorption by agricultural solid wastes: A comprehensive review. *Desalination*, 280(1–3), 1–13. <http://doi.org/10.1016/j.desal.2011.07.019>
- Sambusiti, C., Monlau, F., Ficara, E., Carrère, H., & Malpei, F. (2013). A comparison of different pre- treatments to increase methane production from two agricultural substrates. *Appl. Energy*, (104), 62–70. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2012.10.060>
- Sánchez, C. (2009). Lignocellulosic residues : Biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnology Advances*, 27(2), 185–194. <http://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.11.001>
- Sarkar, N., Ghosh, S. K., Bannerjee, S., & Aikat, K. (2012). Bioethanol production from agricultural wastes: An overview. *Renewable Energy*, 37(1), 19–27. <http://doi.org/10.1016/j.renene.2011.06.045>
- Saucedo-Luna, J., Castro-Montoya, A. J., Rico, J. L., & Campos-Garcia, J. (2010). Otimization of acid hydrolysis of bagasse FROM Agave tequilana Weber. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. ISSN 1665-2738.
- Scheper T., & Olsson L. (1979). *Biofuels - Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. *Biochimie* (Vol. 61). [http://doi.org/10.1016/S0300-9084\(79\)80192-3](http://doi.org/10.1016/S0300-9084(79)80192-3)
- Schwarze, F. W. M. R. (2007). Wood decay under the microscope 5, 21, 133–170. <http://doi.org/10.1016/j.fbr.2007.09.001>
- Sekab. (2017). Biofuel. Disponível em: <http://www.sekab.com/biofuel/> (Acedido a 5 de setembro de 2017)
- Shakoor, S., & Nasar, A. (2016). Removal of methylene blue dye from artificially contaminated water using citrus limetta peel waste as a very low cost adsorbent. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 66, 154–163. <http://doi.org/10.1016/j.jtice.2016.06.009>
- Sheehan, J. (1998). The Role of Bioethanol in Global Climate Change. *Renewable Energy*.

- Shevchenko, S.M., Beatson, R.P., & Saddler, J. N. (1999). The nature of lignin from steam explosion/enzymatic hydrolysis of softwood. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 867 – 876. <http://doi.org/10.1385/ABAB:79:1-3:867>
- Silveira, A. L. C. (2013). *Validação de métodos para a determinação de compostos fenólicos em melancia*.
- Sims, R., Taylor, M., Jack, S., & Mabee, W. (2008). From 1st to 2nd Generation Bio Fuel Technologies: An overview of current industry and RD&D activities. *IEA Bioenergy*, (November), 1–124.
- Singh, S., Wu, C., & Williams, P. T. (2012). Journal of Analytical and Applied Pyrolysis Pyrolysis of waste materials using TGA-MS and TGA-FTIR as complementary characterisation techniques. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 94, 99–107. <http://doi.org/10.1016/j.jaap.2011.11.011>
- Singleton, V., Orthofer, R., & Lamuela\_Raventós, R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent, 299(1974), 152–178. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)99017-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99017-1)
- Söderström, J., Pilcher, L., Galbe, M., & Zacchi, G. (2003). Two-step steam pretreatment of softwood by dilute H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> impregnation for ethanol production. *Biomass and Bioenergy*, 24(6), 475–486. [http://doi.org/10.1016/S0961-9534\(02\)00148-4](http://doi.org/10.1016/S0961-9534(02)00148-4)
- Sofia, B., & Rodrigues, S. (2014). Production and Purification of New Microbial Cellulases: Thesis. *The Journals of Gerontology. Series A, Biological Sciences and Medical Sciences*, 69(6), 773–5. <http://doi.org/10.1093/gerona/glu037>
- Song, Z., Liu, X., Yan, Z., Yuan, Y., & Liao, Y. (2014). Comparison of seven chemical pretreatments of corn straw for improving methane yield by anaerobic digestion. *Plos One* 9, e93801. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0093801>
- Stam, A. F., Livingston, W. R., Cremers, M. F. G., & Brem, G. (2010). Review of models and tools for slagging and fouling prediction for biomass co-combustion. *Review Article for IEA*, (1), 1–18.
- Suganya, T., Varman, M., Masjuki, H. H., & Renganathan, S. (2016). Macroalgae and microalgae as a potential source for commercial applications along with biofuels production: A biorefinery approach. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 55, 909–941. <http://doi.org/10.1016/j.rser.2015.11.026>
- Sun, S., Sun, S., Cao, X., & Sun, R. (2016). The role of pretreatment in improving the enzymatic hydrolysis of lignocellulosic materials. *Bioresource Technology*, 199, 49–58. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.08.061>
- Sun, Y., & Cheng, J. (2002). Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource Technology*, 83(1), 1–11. [http://doi.org/10.1016/S09608524\(0-1\)00212-7](http://doi.org/10.1016/S09608524(0-1)00212-7)
- Sun, Y., & Cheng, J. J. (2005). Dilute acid pretreatment of rye straw and bermudagrass for ethanol production. *Bioresource Technology*, 96(14), 1599–1606. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2004.12.022>
- Swatloski, R., Spear, S., Holbrey, J., & Rogers, R. (2002). Dissolution of cellulose with ionic

- liquids. *JACS*, 124(18), 4974–4975. <http://doi.org/10.1021/ja025790m>
- Szczodrak, J., & Fiedurek, J. (1996). Technology for conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. *Biomass Bioenergy*, (10), 367–375. [https://doi.org/10.1016/0961-9534\(95\)00114-X](https://doi.org/10.1016/0961-9534(95)00114-X)
- Tao, L., Aden, A., Elander, R. T., Pallapolu, V. R., Lee, Y. Y., Garlock, R. J., ... Warner, R. E. (2011). Process and technoeconomic analysis of leading pretreatment technologies for lignocellulosic ethanol production using switchgrass. *Bioresource Technology*, 102(24), 11105–11114. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.07.051>
- Tappi. (2011). Lignin in Wood and Pulp. T222, 1–7. <http://doi.org/10.1023/a:1019003230537>
- The Chemical Company. (2016). Disponível em: <https://thechemco.com/chemical/benzoic-acid/> (Acedido a 03/agosto/2017)
- Travaini, R., Martín-Juárez, J., Lorenzo-Hernando, A., & Bolado-Rodríguez, S. (2016). Ozonolysis: an advantageous pretreatment for lignocellulosic biomass revisited. *Bioresour Technol*, (199), 2–12. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.08.143>
- U.S. Department of Energy. (2014). Alternative Fuels Data Center – Fuel Properties Comparison. *Energy Efficiency & Renewable Energy*, 1–4.
- UNCTAD. (2016). *Second generation biofuel markets: state of play, trade and developing country perspectives*.
- Vallinayagam, R., Vedharaj, S., Yang, W. M., Roberts, W. L., & Dibble, R. W. (2015). Feasibility of using less viscous and lower cetane (LVLC) fuels in a diesel engine: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 51, 1166–1190. <http://doi.org/10.1016/j.rser.2015.07.042>
- Vasconcelos, N. M. de, Pinto, G. A. S., & Aragão, F. A. de S. (2013). Determinação de Açúcares Redutores pelo Ácido 3,5-Dinitrosalicílico. *Boletim de Pesquisa Número 9 - Embrapa*, 1–59. <http://doi.org/1980-6841>
- Vázquez-guerrero, A., Alfaro-cuevas-villanueva, R., & Cortés-martínez, R. (2016). Fluoride removal by aluminum-modified pine sawdust: Effect of competitive ions, 94, 365–379. <http://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2016.05.070>
- Velázquez, C., Guadalupe, M., Rojas, V., Alvarez, C., Chávez-servín, J. L., García-gasca, T., ... Carbot, T. (2015). Total phenolic compounds in milk from different species . Design of an extraction technique for quantification using the Folin-Ciocalteu method, 176, 480–486. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.12.050>
- Wang, W., Zhuang, X., Yuan, Z., Yu, Q., & Qi, W. (2015). Investigation of the pellets produced from sugarcane bagasse during liquid hot water pretreatment and their impact on the enzymatic hydrolysis. *Bioresour Technol.*, (190), 7–12. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.04.059>
- Wang, Z., Yang, J., Li, Z., & Xiang, Y. (2009). Syngas composition study. *Frontiers of Energy and Power Engineering in China*, 3(3), 369–372. <http://doi.org/10.1007/s11708-009-0044-7>
- Wannapeera, J., Fungtammasan, B., & Worasuwanarak, N. (2011). Journal of Analytical and Applied Pyrolysis Effects of temperature and holding time during torrefaction on the pyrolysis behaviors of woody biomass. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 92(1),

- 99–105. <http://doi.org/10.1016/j.jaap.2011.04.010>
- Wilson, T., Baker, R., Ricketts, M., Roe, S., Wilson, C., & Koehler, N. (2016). Ethanol Industry Outlook, 1–31.
- Wingren, A., Galbe, M., & Zacchi, G. (2003). Techno-Economic Evaluation of Producing Ethanol from Softwood: Comparison of SSF and SHF and Identification of Bottlenecks. *Biotechnology Progress*, 46(19), 1109–1117. <http://doi.org/10.1021/bp0340180>
- Won, M., Done, S., Hoon, S., & Goo, J. (2010). Journal of Analytical and Applied Pyrolysis Pyrolysis characteristics of coal and RDF blends in non-isothermal and isothermal conditions. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 88(2), 160–167. <http://doi.org/10.1016/j.jaap.2010.03.010>
- Wong, Z., Chen, K., & Li, J. (2010). Formation of vanillin and syringaldehyde in an oxygen delignification process. *BioResources*, 5(3), 1509–1516. ISSN: 1930-2126
- World Bank Group, 1998. Nitrogen Oxides. Pollution Prevention and Abatement Handbook.
- Yaman, S., & Haykiri-acma, H. (2016). Journal of Analytical and Applied Pyrolysis A study to predict pyrolytic behaviors of refuse-derived fuel (RDF): Artificial neural network application, 122, 84–94. <http://doi.org/10.1016/j.jaap.2016.10.013>
- Yang, B., & Wyman, C. E. (2008). Pretreatment: The key to unlocking low-cost cellulosic ethanol. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 2(1), 26–40. <http://doi.org/10.1002/bbb.49>
- Yat, S. C., Berger, A., & Shonnard, D. R. (2008). Kinetic characterization for dilute sulfuric acid hydrolysis of timber varieties and switchgrass. *Bioresource Technology*, 99(9), 3855–3863. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.06.046>
- Yu, Q., Zhuang, X., Wang, Q., Qi, W., Tan, X., & Yuan, Z. (2012). Hydrolysis of sweet sorghum bagasse and eucalyptus wood chips with liquid hot water. *Bioresource Technology*, 116, 220–225. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.04.031>
- Zabed, H., Sahu, J. N., Boyce, A. N., & Faruq, G. (2016). Fuel ethanol production from lignocellulosic biomass: An overview on feedstocks and technological approaches. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 66, 751–774. <http://doi.org/10.1016/j.rser.2016.08.038>
- Zabed, H., Sahu, J. N., Suely, A., Boyce, A. N., & Faruq, G. (2017). Bioethanol production from renewable sources: Current perspectives and technological progress. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 71(October 2015), 475–501. <http://doi.org/10.1016/j.rser.2016.12.076>
- Zhai, M., Guo, L., Wang, Y., Zhang, Y., Dong, P., & Jin, H. (2016). ScienceDirect Process simulation of staging pyrolysis and steam gasification for pine sawdust. *International Journal of Hydrogen Energy*, 41(47), 21926–21935. <http://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2016.10.037>
- Zhang, Y., Zhang, Z., Zhu, M., Cheng, F., & Zhang, D. (2016). Bioresource Technology Interactions of coal gangue and pine sawdust during combustion of their blends studied using differential thermogravimetric analysis. *Bioresource Technology*, 214, 396–403. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.04.125>
- Zheng, J., & Rehmann, L. (2014). Extrusion pretreatment of lignocellulosic biomass: A review.

*International Journal of Molecular Sciences*, 15(10), 18967–18984.  
<http://doi.org/10.3390/ijms151018967>

Zheng, Y., Zhao, J., Xu, F., & Li, Y. (2014). Pretreatment of lignocellulosic biomass for enhanced biogas production. *Prog. Energy Combust. Sci.*, (42), 35–53.  
<https://doi.org/10.1016/j.pecs.2014.01.001>

Zhu, J. Y., & Pan, X. J. (2010). Woody biomass pretreatment for cellulosic ethanol production: Technology and energy consumption evaluation. *Bioresource Technology*, 101(13), 4992–5002. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.11.007>

Zhuang, X., Wang, W., Yu, Q., Qi, W., Wang, Q., Tan, X., Yuan, Z. (2016). Liquid hot water pretreatment of lignocellulosic biomass for bioethanol production accompanying with high valuable products. *Bioresource Technology*, 199, 68–75. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.08.051>